

Desenvolvimento de pães sem glúten enriquecidos com microalgas

Inês Filipa Santana Vasco

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Alimentar

Orientadores: Doutora Maria Cristiana Henriques Nunes

Doutora Anabela Cristina da Silva Naret Moreira Raymundo

Júri:

Presidente: Vítor Manuel Delgado Alves, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Vogais: Doutora Isabel Maria Nunes de Sousa, Professora Associada com Agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Doutora Maria Cristiana Henriques Nunes, Professora Auxiliar da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Agradecimentos

Seria incorreto apresentar este trabalho sem enaltecer as pessoas que, juntamente comigo, fizeram dele uma jornada concretizada com sucesso.

Primeiro agradecer às minhas orientadoras, Doutora Cristiana Nunes e Doutora Anabela Raymundo, que me receberam tão bem neste projeto desde o primeiro dia e de tudo fizeram para que este trabalho tivesse o sucesso e destaque que as três pretendíamos. No entanto, seria muito superficial agradecer assim a estas duas grandes mulheres, por isso, e mais concretamente, à professora Doutora Cristiana Nunes por cada minuto de conversa, cada sorriso familiar, cada explicação detalhada até das dúvidas mais simples e por me ter recebido assim, uma aluna não familiar, como se me conhecesse desde sempre e tivesse a plena certeza de todo o meu potencial. Também à professora Doutora Anabela Raymundo, por ter inspirado desde o tempo em que foi minha professora até agora, pelo seu rigor e pela paixão que fala de todos os seus projetos, pelo espírito de sacrifício que demonstra em chegar a todos os lados quando solicitada e por ter ideias brilhantes nas discussões de resultados.

Depois e não menos importante àqueles que são a minha vida, os meus avós. Os avós que sempre foram uns pais, que deram força durante todo o percurso de vida e neste caso concreto no percurso académico, que ouviram cada sonho e ideia, cada desgosto e conquista. Não podia passar sem destacar estes seres maravilhosos, a avó Elvira que tem o sorriso mais jovem de sempre, a paciência para se sentar a beber um café e falar durante horas sobre tudo, a pessoa a quem corremos para telefonar quando algo de bom e menos bom acontece, aquela que ensina que tudo são aprendizagens e temos que tirar o melhor partido de tudo; ao avô Francisco, essa força da natureza que desde pequena se tornou um exemplo a seguir, pelo seu carisma, pela sua electricidade constante, pelo coração mole e pela alma tão apaixonada pela vida e convicção em tudo o que se mete que transbordam pelos olhos. Muito obrigado a eles, que fizeram de mim a pessoa que sou!

Ao Hugo, a maior surpresa que esta faculdade me poderia ter trazido, quando eu apenas pensava que só vinha fazer um mestrado e seguir para o emprego de sonho. À calma que ele é no meio da tempestade que sou eu, ao incentivo, às críticas construtivas e à força e convicção que dá mostrando-me que eu sou, ou posso ser, a melhor do mundo, mesmo que eu não ache o mesmo. Obrigado meu amor.

Obrigado também aos amigos antigos que acompanharam todo o percurso e também às novas pessoas que conheci e que tornaram os dias menos cansativos e mais sorridentes, mesmo quando a vontade de sorrir não era nenhuma.

A todos, que têm um lugar no meu coração, e a mim, obrigado por este percurso!

Resumo

Estima-se que 1% da população mundial e 3% da população nacional seja intolerante ao glúten. Estes doentes necessitam de uma dieta restrita de glúten (APC 2019). Simultaneamente, a população não celíaca tem demonstrado interesse na alimentação isenta de glúten, defendendo os seus benefícios a nível nutricional. Consequentemente, a procura pelos produtos isentos de glúten tem vindo a aumentar apesar destes serem considerados caros e com deficiências a nível sensorial. Como forma de melhorar a oferta de alimentos isentos de glúten, prezando-se pela inovação, vários ingredientes, como as microalgas, têm sido explorados. Estas são conhecidas pelo elevado valor proteico, constituição em lípidos, hidratos de carbono e compostos bioativos com poder antioxidante.

O principal objetivo deste trabalho foi o estudo do impacto do pré-tratamento para a disrupção celular da biomassa microalgal no desenvolvimento de pães isentos de glúten com incorporação de *Tetraselmis chuii*. A disrupção celular é um processo que promove a libertação de compostos presentes no interior da parede celular. Para estudar a funcionalidade da microalga e o impacto da disrupção celular e do tratamento térmico subsequente, prepararam-se suspensões de *Tetraselmis chuii* a 10% (m/v) com diferentes níveis de disrupção celular, estudou-se o comportamento reológico, concentração de compostos fenólicos e compostos com atividade antioxidante, através dos métodos de *Folin-Ciocalteu*, DPPH e FRAP. Para os sistemas concentrados, massas e pães, avaliou-se a textura e reologia das massas, aspeto geral, textura e parâmetros de qualidade dos pães, cor das massas e pães, e concentração de compostos bioativos. Nos sistemas diluídos as suspensões apresentam uma alta capacidade antioxidante, apesar de a concentração de compostos fenólicos ser reduzida. A incorporação de biomassa microalgal em sistemas concentrados originou produtos com elevado poder antioxidante, promovido pelos níveis de disrupção elevados, para além de características tecnológicas desejáveis para utilização industrial, com reforço da estrutura devido à maior firmeza.

Palavras-chave: pão isento de glúten, *Tetraselmis chuii*, disrupção celular, reologia, atividade antioxidante.

Abstract

It's estimated that 1% of global population and 3% of portuguese population has celiac disease (APC 2019). Non celiac patients have shown interest in gluten-free foods, because they think that is more beneficial for their health. The demand for gluten free products has increased, however, they have high prices and are not always very favorable, from a sensory point of view. Demand for innovative foods, with bioactive ingredients, has also increased and microalgae are one of the answers. Microalgae are rich in protein, lipids, carbohydrates and in bioactive compounds with antioxidant activity, with positive impact in human health.

The main objective of this work was to study the impact of ,microalgae biomass pre-treatment and understand how much cellular disruption methods influence the quality of gluten free breads incorporated with the algae *Tetraselmis chuii*. Cellular disruption promotes the release of intracellular compounds from the microalgae inside though the cellular wall. With the goal of study the microalgae functionality, the impact of cellular disruption and thermal treatment, suspensions of *Tetraselmis chuii* at 10% disruption m/v were made and their rheologic behavior, antioxidant activity and phenolic content was studied, using FRAP, DPPH and *Folin-Ciocalteu* methodology. Throughout the work the impact of cellular disruption in concentrated systems with *Tetraselmis chuii* was also studied using methodologies such as texture evaluation for the dough and bread, rheology, color of dough and breads and antioxidant activity though the determination of phenolic compounds and antioxidant power.

In the microalgae diluted systems the phenolic content is low and the low availability in the suspension without cell disruption is notorious. The gluten free breads showed more antioxidant power than the microalgae diluted suspensions, and also, desirable technological characteristics for the industry, since they feature high firmness, promoted by the high protein content, that strengthens the structure.

Key-words: gluten-free bread, *Tetraselmis chuii*, celular disruption, rheology, antioxidant activity

Índice

_Toc25271906

Agradecimentos	ii
Resumo	iv
Abstract	v
Índice	vi
Índice de figuras	ix
Índice de tabelas	xi
Índice de Abreviaturas	xii
Introdução e objetivos	1
1. Revisão Bibliográfica	3
1.1. Alimentação isenta de glúten	3
<u>1.1.1. Glúten</u>	3
<u>1.1.2. Doença celíaca</u>	4
<u>1.1.3. Novos desafios</u>	5
1.1.3.1. Farinhas e amidos	6
1.1.3.2. Hidrocolóides	7
1.1.3.2.1. Hidroxipropilmetilcelulose (HPMC)	8
1.1.3.3. Outros ingredientes	9
1.2. Microalgas	11
<u>1.2.1. <i>Tetraselmis chuii</i></u>	13
<u>1.2.2. Impacto do processamento nas propriedades físico-químicas das microalgas</u>	14
<u>1.2.3. Disrupção</u>	17
<u>1.2.4. Métodos de disrupção celular</u>	17
1.3. Antioxidantes	19
<u>1.3.1. Compostos fenólicos</u>	20
<u>1.3.2. Vitamina E</u>	21
<u>1.3.3. Pigmentos naturais</u>	21
<u>1.3.4. Vitamina C</u>	23
<u>1.3.5. Os antioxidantes como fonte de compostos bioativos nas microalgas</u>	24
1.4. Metodologias	24

1.4.1.	<u>Avaliação de antioxidantes</u>	24
1.4.1.1.	FRAP	25
1.4.1.2.	Capacidade redutora pelo método Folin – Ciocalteu – Determinação de fenóis totais	26
1.4.1.3.	Capacidade de captação do radical DPPH.....	27
1.4.2.	<u>Textura</u>	28
1.4.3.	<u>Comportamento reológico</u>	29
1.4.3.1.	Micro-doughLAB.....	31
1.4.4.	<u>Avaliação da cor</u>	32
2.	Materiais e Métodos	34
2.1.	Materiais	34
2.2	Métodos	34
2.2.1.	<u>Sistemas diluídos</u>	34
2.2.1.1.	Preparação das amostras	34
2.2.1.2.	Bioatividade.....	35
2.2.1.2.1.	Determinação de compostos fenólicos totais (F-C)	35
2.2.1.2.2.	Determinação de compostos com atividade antioxidante utilizando o método DPPH	36
2.2.1.2.3.	Determinação de compostos com atividade antioxidante utilizando o método FRAP	36
2.2.1.3.	Análise do comportamento reológico dos sistemas diluídos	37
2.2.2.1.	Preparação dos pães com <i>Tetraselmis chuii</i>	38
2.2.2.2.	Análise das propriedades reológicas das massas durante a mistura	39
2.2.2.4.	Análise das propriedades viscoelásticas das massas	39
2.2.2.3.	Avaliação da textura das massas e pães	40
2.2.2.5.	Análise do pH	41
2.2.2.6.	Análise instrumental da cor das massas, cor do miolo e da còdea dos pães	42
2.2.2.7.	Análise da atividade da água (aw) dos pães	42
2.2.2.8.	Análise da humidade dos pães	42
2.2.2.9.	Análise estatística	42
3.	Resultados e Discussão	44
3.1.	Sistemas diluídos de <i>Tetraselmis chuii</i>	44
3.1.1.	<u>Antioxidantes</u>	44
3.1.1.1.	Cinéticas de extração de compostos fenólicos e compostos com atividade antioxidante.....	48
3.1.2.	<u>Avaliação do comportamento reológico das suspensões</u>	51
3.2.	Sistemas concentrados com <i>Tetraselmis chuii</i>	53
3.2.1.	<u>Propriedades reológicas das massas durante a mistura</u>	53

<u>3.2.2. Propriedades de textura das massas</u>	55
<u>3.2.3. Propriedades viscoelásticas das massas</u>	56
<u>3.2.4. Cor das massas</u>	58
<u>3.2.5. Propriedades de textura dos pães</u>	60
<u>3.2.6. Cor do miolo e da côdea dos pães</u>	61
<u>3.2.7. Atividade da água, humidade e perdas na cozedura dos pães</u>	63
<u>3.2.8. Bioatividade das massas e pães</u>	64
4. Conclusões	71
5. Bibliografia	1

Índice de figuras

Figura 1 - Alteração histológica do intestino delgado: Vilosidades intestinais normais (a) e vilosidades intestinais de um doente celiaco (b). Fonte: Adaptado de http://pedsinreview.aappublications.org/content/35/10/409	4
Figura 2 - Símbolo usado na rotulagem para fazer referência a produtos sem glúten.....	5
Figura 3 - Fórmula de estrutura de HPMC. Denominação química: éter-2-hidroxipropílico de metilcelulose.	8
Figura 4 - Tetraselmis chuii (vista microscópica). Fonte: (UTEX, 2018).....	13
Figura 5 - Representação de funcionamento do método de moinho de esferas. Fonte: Adaptado de (Ishii, 2018)	19
Figura 6 - Estrutura química de antocianinas. Fonte: Adaptado de (Guimarães et al., 2012).....	20
Figura 7 - Estrutura química de taninos: taninos condensados (A) e taninos hidrolisáveis (B).	21
Figura 8 - Estrutura química do α -tocoferol (Vitamina E). Fonte: Adaptado de: https://www.infoescola.com/bioquimica/vitamina-e/	21
Figura 9 - Estrutura química da clorofila a e b. Fonte: Adaptado de: (Streit et al., 2005)	22
Figura 10 - Estrutura química do β – caroteno. Fonte: (World of Molecules, 2016).....	23
Figura 11 - Estrutura química do ácido ascórbico (Vitamina C). Fonte: (Manual da Química, 2019)	23
Figura 12 - Redução do complexo contendo Fe^{3+} ao complexo contendo Fe^{2+} - Método FRAP.....	26
Figura 13 - Reação de Folin - Ciocalteu com transferência de elétrons e espécies redutoras de molibdênio para determinação de fenóis totais. Fonte: Adaptado de: (Bioquochem, 2019)	27
Figura 14 - Redução de DPPH na presença de um antioxidante doador de um átomo de hidrogénio.....	28
Figura 15 - Texturograma obtido no teste de Análise de Perfil de Textura.	29
Figura 16 - Curva de mistura obtida pelo micro-doughLAB com identificação dos parâmetros a analisar. Fonte: Adaptado de (Perten Instruments, 2017).....	32
Figura 16 - Reómetro com sistema sensor de dopratos paralelos serrados com massa de Tc	40
Figura 17 - Teste de perfil de estrutura (TPA) na massa com Tc (à esquerda) e no pão (direita), com uma sonda de 10mm Ø, realizado no texturómetro	41
Figura 18 - Concentração de compostos fenólicos totais para os sistemas diluídos de Tetraselmis chuii antes e depois do tratamento térmico.....	44
Figura 19 - Concentração de compostos com atividade antioxidante pelo método DPPH para os sistemas diluídos antes e depois do tratamento térmico.	45
Figura 20 - Concentração de compostos com capacidade antioxidante pelo método FRAP dos sistemas diluídos antes e depois do tratamento térmico.....	45
Figura 21 - Correlação entre o método FRAP e de F-C, para determinação de atividade antioxidante e concentração de compostos fenólicos, respetivamente, com um R^2 de 0,78.	47
Figura 22 - Cinética de extração de compostos fenólicos totais ao longo de 5 horas de agitação das suspensões de Tetraselmis chuii com diferentes níveis de disrupção.	48
Figura 23 - Cinética de extração de compostos com capacidade antioxidante, quantificados através do método de DPPH, ao longo de 5 horas de agitação das suspensões de Tetraselmis chuii com diferentes níveis de disrupção	49

Figura 24 - Cinética de extração de compostos com capacidade antioxidante, quantificados através do método de FRAP, ao longo de 5 horas de agitação das suspensões de <i>Tetraselmis chuii</i> com diferentes níveis de ruptura.....	49
Figura 25 - Evolução do módulo elástico (G') durante o varrimento de temperatura (aquecimento de 20°C a 90°C e arrefecimento de 90°C a 20°C) dos sistemas diluídos de Tc nativa, 66, 77 e 99% de ruptura.....	51
Figura 26 - Evolução do módulo elástico (G') durante os varrimentos de tempo e temperatura dos sistemas diluídos com Tc nativa, 66, 77 e 99% de ruptura.....	51
Figura 27 - Espectro mecânico dos sistemas diluídos de Tc nativa com 66, 77 e 99% de ruptura, após tratamento térmico.....	52
Figura 28 - Valores de G' a 0,628, 6,28, 62,8 rad/s dos sistemas diluídos de Tc sem ruptura (nativa) e com 66, 77 e 99% de ruptura.....	53
Figura 29 - Curvas obtidas no micro-doughLAB para todas as formulações controlo e com incorporação de <i>Tetraselmis chuii</i> com diferentes níveis de ruptura.....	54
Figura 30 - Valores de firmeza das massas fermentadas: massa controlo e massas com incorporação de <i>Tetraselmis chuii</i> com diferentes níveis de ruptura.....	55
Figura 31 - Valores de coesividade das massas fermentadas: massa controlo e massas com incorporação de <i>Tetraselmis chuii</i> com diferentes níveis de ruptura.....	56
Figura 32 - Espectros mecânicos a 5°C das massas fermentadas controlo e com incorporação de <i>Tetraselmis chuii</i> com diferentes níveis de ruptura.....	57
Figura 33 - Valores de G' retirados dos espectros mecânicos a 0,628 rad/s , 6,28 rad/s e 62,8 rad/s Hz das massas fermentadas controlo e com incorporação de Tc com diferentes níveis de ruptura. As massas com incorporação de Tc com 66% e 77% são não significativamente diferentes.....	58
Figura 34 - Massas fermentadas: à esquerda massa fermentada sem incorporação de microalga; à direita massa fermentada com incorporação de 4% de <i>Tetraselmis chuii</i>	59
Figura 35 - Valores de firmeza do pão: pão controlo e pão com incorporação de Tc com diferentes níveis de ruptura. *Letras iguais correspondem a valores não significativamente diferentes entre as massas ($p>0,05$).....	60
Figura 36 - Valores de coesividade do pão: pão controlo e pão com incorporação de Tc com diferentes níveis de ruptura. *Letras iguais correspondem a valores não significativamente diferentes entre as massas ($p>0,05$)......	61
Figura 37 - Miolo de cada um dos pães analisados: pão controlo, pão com incorporação de Tc sem ruptura, pão com 66% de ruptura, pão com 77% de ruptura e pão com 99% de ruptura (da esquerda para a direita).....	62
Figura 38 - Miolo de cada um dos pães analisados: pão controlo, pão com incorporação de Tc sem ruptura, pão com 66% de ruptura, pão com 77% de ruptura e pão com 99% de ruptura (da esquerda para a direita).....	62
Figura 39 - Resultados obtidos para a massa controlo e massas com incorporação de microalga com diferentes níveis de ruptura, pelo método de F-C – determinação de fenóis totais.....	64
Figura 40 - Resultados obtidos para a massa controlo e massas com incorporação de microalga com diferentes níveis de ruptura, pelo método de DPPH – determinação da atividade antioxidante.....	65
Figura 41 - Resultados obtidos para a massa controlo e massas com incorporação de microalga com diferentes níveis de ruptura, pelo método de FRAP– determinação da atividade antioxidante.....	65

Figura 42 - Resultados obtidos para o pão controlo e pães com incorporação de microalga com diferentes níveis de disrupção, pelo método de F-C – determinação de compostos fenólicos.....	67
Figura 43 - Resultados obtidos para o pão controlo e pães com incorporação de microalga com diferentes níveis de disrupção, pelo método de DPPH – determinação da atividade antioxidante.....	68
Figura 44 - Resultados obtidos para o pão controlo e pães com incorporação de microalga com diferentes níveis de disrupção, pelo método de FRAP – determinação da atividade antioxidante.....	68
Figura 45 - Correlação entre o método F-C para determinação de compostos fenólicos totais na massa fermentada e no pão com incorporação de microalga.	69

Índice de tabelas

Tabela 1 - Composição nutricional da Tetraselmis chuii liofilizada, produzida pelos parceiros do projeto A2F (NOFIMA).	34
Tabela 3 - Descrição dos ingredientes e respetivas percentagens utilizados na formulação de pão com Tetraselmis chuii	38
Tabela 4 - Resultados obtidos no Microdough-LAB para as diferentes massas: massa controlo e massa com incorporação de microalga com diferentes níveis de disrupção.....	54
Tabela 5 - Valores do parâmetro L* e das coordenadas cromáticas a* e b* das massas fermentadas.	59
Tabela 6 - Valores do parâmetro L* e das coordenadas cromáticas a* e b* para o miolo dos pães.....	62
Tabela 7 - Valores do parâmetro L* e das coordenadas cromáticas a* e b* para a cêdea dos pães.....	63
Tabela 8 - Valores de atividade da água (a_w), humidade e percentagem de perdas na cozedura para os diferentes pães.....	63

Índice de Abreviaturas

A2F – *Algae to Future*

PUFA – Polyunsaturated fatty acid/Ácidos gordos polinsaturados

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations /Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação

CD – Celiac Disease/Doença Celíaca

HLA – Human Leukocyte antigen/Antigénio de Leucócito Humano

APC – Associação Portuguesa de Celíacos

GF – Gluten Free / Isento de glúten

GFB – Gluten Free Breads / Pães sem glúten

HPMC – Hydroxypropyl methylcellulose/Hidroxipropilmetilcelulose

WHO – World Health Organization/Organização Mundial de Saúde

JECFA – Joint FAO/WHO Expert Committee on Foods Additives/Comité Conjunto de Especialistas da FAO/OMS sobre Aditivos Alimentares

SCF – Scientific Committee on Food/Comité Científico da Alimentação Humana

EFSA – European Food Safety Authority/Autoridade Europeia de Segurança Alimentar

EPA – Eicosapentaenoic Acid/Ácido Eicosapentaenoico

DHA – Docosahexaenoic Acid/Ácido Docosahexaenoico

TEAC – Trolox Equivalent Antioxidant Capacity/Capacidade Antioxidante medida em Equivalentes Trolox

ORAC – Oxygen Radical Absorbance Capacity/Capacidade de Absorvência do Radical Oxigénio

TRAP – Total Peroxyl Radical Antioxidant Parameter/Potencial Antioxidante Reativo Total

FRAP – Ferric Reducing Antioxidant Power/Poder Antioxidante pela Redução do Ião Férrico

CUPRAC – CUPric Reducing Antioxidant Capacity/Capacidade Antioxidante pela Redução do Ião Cobre

F-C – *Folin-Ciocalteu*

DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

HAT – Hydrogen Atom Transfer/Transferência de Átomos de Hidrogénio

ET – Electron Transfer/Transferência de Eletrões

TPA – Texture Profile Analysis/Análise de Perfil de Textura

a_w – Atividade de água

Tc – *Tetraselmis chuii*

Introdução e objetivos

A presente dissertação para obtenção de grau de mestre em Engenharia Alimentar foi realizada no âmbito do projeto “A2F – *Algae To Future*”, projeto financiado pelo *Research Council of Norway* e que conta com 26 parceiros internacionais, incluindo Portugal, mais concretamente, o Instituto Superior de Agronomia. Com este projeto pretende-se explorar o potencial das microalgas como novos ingredientes, tanto para alimentação animal como para alimentação humana. Este novo ingrediente é um ingrediente sustentável, com uma reduzida pegada de carbono no processo de produção, e com inúmeros compostos biológicos de interesse, com funções antioxidantes, anti-tumorais e anti-inflamatórias, bem como um grande valor nutricional, sendo de destacar a constituição em proteína e ácidos gordos polinsaturados ómega-3. Vários produtos têm sido desenvolvidos com microalgas, desde bolachas a géis (L Gouveia et al. 2008; Batista et al. 2017). A atividade do Instituto Superior de Agronomia neste projeto é o desenvolvimento de pães isentos de glúten, com incorporação de microalgas com elevado teor proteico, envolvendo diversas tarefas que vão desde a caracterização da biomassa produzida no projeto, passando pela utilização de formulações de pão sem glúten enriquecido com microalgas, até à sua validação final em termos sensoriais e avaliação do seu potencial e impacto na saúde.

Estudos que englobam a população celíaca são de grande interesse mundial, uma vez que nos últimos anos tem-se verificado um maior número de diagnósticos desta doença. Em Portugal os valores rondam os 3% e no mundo inteiro 1% (APC 2019). Tendo em conta que estes doentes têm apenas como solução de tratamento fazerem uma dieta isenta de glúten, é essencial desenvolver alimentos funcionais que lhes providenciem todos os índices nutricionais e sejam, simultaneamente, atrativos sensorialmente. Paralelamente a este foco crescente na doença celíaca, tem-se verificado também um interesse crescente em alimentos sem glúten por parte da população não celíaca, por acharem que estes são mais benéficos para a saúde. Apesar de todo este interesse, os alimentos sem glúten são difíceis de encontrar em alguns locais, apresentam um preço elevado e nem sempre são convincentes do ponto de vista sensorial (Hager e Arendt, 2013; Capriles e Arêas, 2014).

A *Tetraselmis chuii* é uma microalga verde, unicelular, com propriedades importantes para a saúde humana. Para além disso tem sido utilizada em aquacultura e biorrefinaria devido à sua composição em ácidos gordos polinsaturados (PUFA) de cadeia longa. A adição desta microalga confere cor à massa do pão, e pode influenciar a estrutura e propriedades sensoriais, ao mesmo tempo que confere ao produto um elevado teor em proteína, PUFA e

compostos bioativos como vitamina E, clorofila e carotenoides, compostos com elevada capacidade antioxidante (Mohammadi et al. 2015; Bonilla-Ahumada et al., 2018).

O principal objetivo deste trabalho foi o estudo do impacto do processo de ruptura celular nas propriedades reológicas e parâmetros de qualidade de pães isentos de glúten com incorporação da microalga *Tetraselmis chuii*, usando uma formulação previamente desenvolvida (Fernandes 2019). Avaliou-se ainda a bioatividade - compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante, recorrendo a três diferentes métodos: Folin-Ciocalteu, DPPH e FRAP, respetivamente. Foi feita a avaliação instrumental da textura e reologia das massas (testes empíricos no micro-doughLAB e testes dinâmicos), aspeto geral, textura e parâmetros de qualidade dos pães e da cor das massas e dos pães, . Foram ainda estudadas suspensões diluídas de *Tetraselmis chuii* a 10% (m/v) com diferentes níveis de ruptura celular conseguidos através de processamento em moinho de esferas, de forma a estudar o impacto desta ruptura celular, e do processamento térmico posterior, no comportamento reológico e capacidade antioxidante da microalga.

O presente trabalho foi incluído nos seguintes resumos (anexos) submetidos a congressos científicos:

- Nunes, M.C., Vasco, I., Kokkali, M., Kousoulaki, K., Sousa, I., Raymundo, A. (2019). Impact of cell disruption and thermal processing on rheological properties and antioxidant activity of microalgal suspensions. Book of Abstracts of IBEREO 2019. Pp.45 (Porto, Portugal, 4-6 September). Oral Communication P&B15. <http://ibereo2019.com/>
- M. Cristiana Nunes, Inês Vasco, Marilena Kokkali, Katerina Kousoulaki, Isabel Sousa, Anabela Raymundo, Improving gluten free bread bioactivity with *Tetraselmis chuii* disrupted biomass, AlgaeEurope 2019 (comunicação oral).

1. Revisão Bibliográfica

1.1. Alimentação isenta de glúten

1.1.1. Glúten

As frações proteicas que vão dar origem ao glúten, principalmente as gliadinas e gluteninas, encontram-se no endosperma de alguns cereais sob diferentes formas e concentrações. As prolaminas, constituintes da fração proteica, encontram-se no trigo sob forma de gliadinas, no centeio sob forma de secalinas, na cevada sob forma de hordeínas e na aveia sob forma de aveninas (Schofield 1996).

As proteínas do trigo podem ser divididas em proteínas solúveis (albuminas e globulinas) e proteínas de reserva (gliadinas e gluteninas). O glúten é composto pelas frações gliadina e glutenina, no caso do trigo. As gliadinas são formadas por cadeias simples com ligações dissulfeto intramoleculares, de subunidades de baixo peso molecular, e quando hidratadas apresentam uma textura viscosa, conferindo extensibilidade e poder lubrificante à massa. Já as gluteninas são formadas por uma cadeia complexa com ligações dissulfeto intra e intermoleculares, com subunidades de alto e baixo peso molecular, conferindo elasticidade à massa.

Este complexo é estável a altas temperaturas, confere boa textura aos alimentos e ainda lhes confere um sabor agradável, sendo por isso fundamental na indústria panificadora. Este complexo começa a ser formado quando as proteínas do glúten são hidratadas e na presença de energia mecânica interagem entre si. Na interação ocorre quebra de ligações intramoleculares e uma nova reorientação das proteínas que contêm grupos tiol, que por sua vez vão reagir com os agentes oxidantes originando novas ligações dissulfeto intra e intermoleculares e pontes de hidrogénio que, em associação a forças hidrofóbicas e iónicas formam uma cadeia de proteínas contíguas. Ao sofrer amassadura forma-se uma matriz tridimensional, o glúten, que tem propriedades viscoelásticas e é insolúvel em água. O glúten é ainda o responsável pela fixação de água e amido, conferindo elasticidade e textura ao produto final, bem como capacidade de retenção de dióxido de carbono, durante o processo de fermentação e cozedura (Schofield, 1996; Cornel e Hoveling, 1998).

A Comissão do *Codex Alimentarius* estabeleceu um teor máximo de prolaminas (de 20mg/kg permitido para que um produto possa assumir-se como “isento de glúten” (FAO 2008).

1.1.2. Doença celíaca

A doença celíaca (DC), enteropatia sensível ao glúten, é uma doença autoimune que afeta indivíduos com predisposição genética quando sujeitos a uma dieta que contenha glúten. Esta doença pode ser resultante de um conjunto de fatores como ambientais, genéticos e imunológicos, ao qual é associado o glúten, fator indutor da doença (APC 2019). Na verdade, os indivíduos com esta patologia possuem intolerância às prolaminas, proteínas de reserva que estão presentes em vários cereais como trigo, centeio, cevada, entre outros, daí a sua dieta restringir alimentos que contenham ou possam conter estes cereais (Nascimento *et al.*,2012)

A doença celíaca está relacionada com o complexo genético do antígeno do leucócito humano (HLA), nomeadamente com os antígenos de histocompatibilidade HLA-DQ2 (presente em 90- 95% dos indivíduos celíacos) e HLA-DQ8 (presente em 5% dos indivíduos celíacos). Há uma resposta imunitária quando são ingeridas a gliadina e glutenina, porque as moléculas DQ2 e DQ8 têm uma grande afinidade para os péptidos que as constituem, após ocorrer a degradação enzimática pela transglutaminase tecidual (tTG) no intestino. Estes complexos originam multiplicação e libertação de citocinas, responsáveis pelos danos na mucosa do intestino delgado, tornando as vilosidades achatadas e inflamadas (Figura 1) originando por consequência, uma absorção deficiente de nutrientes, vitaminas, sais minerais e água (Nobre *et al.*,2007). Os sintomas recorrentes são a perda de apetite, perda de peso, distensão e saliência do abdómen, vômitos de repetição, dores abdominais de intensidade variável, prisão de ventre ou fezes mais frequentes, moles e volumosas e atraso de crescimento (Nascimento *et al.*,2012).

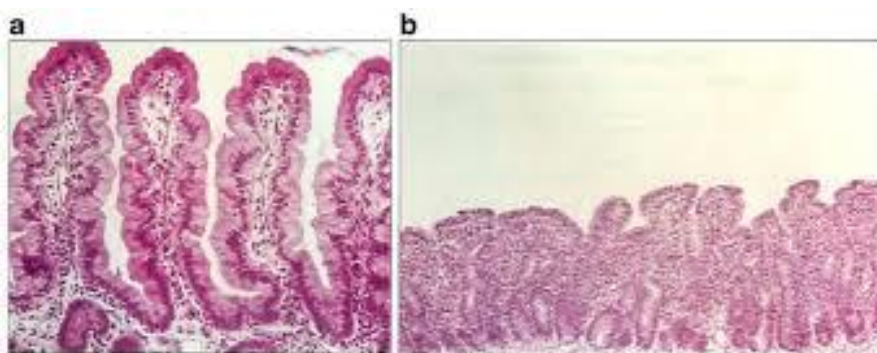


Figura 1 - Alteração histológica do intestino delgado: Vilosidades intestinais normais (a) e vilosidades intestinais de um doente celíaco (b). Fonte: Adaptado de <http://pedsinreview.aappublications.org/content/35/10/409>.

Na Europa 1 em cada 79-200 indivíduos apresenta esta patologia; Já em Portugal estima-se que 1 a 3% da população seja celíaca, no entanto, esta é uma doença largamente subdiagnosticada estimando-se assim que existam entre 70.000 a 100.000 celíacos portugueses (APC 2019). Todos os alimentos isentos de glúten apresentam o símbolo representado na Figura 2.



Figura 2 - Símbolo usado na rotulagem para fazer referência a produtos sem glúten.

Fonte: Adaptado de (APC 2019)

Resultante do défice de absorção de nutrientes, como vitaminas e sais minerais, os doentes celíacos necessitam de englobar na sua dieta alimentos com características nutricionais específicas, como por exemplo, alimentos ricos em minerais, vitaminas, antioxidantes, que recuperem algumas das defesas do sistema imunitário e reponham os níveis em falta.

1.1.3. Novos desafios

O antigo e pequeno nicho de mercado de produtos isentos de glúten (GF) tem sofrido um crescimento nestes últimos anos, tornando-se uma tendência de consumo no sector alimentar. Este crescimento deve-se ao aumento dos consumidores que tentam evitar o glúten na sua ingestão diária porque acreditam que os produtos GF são mais saudáveis e que a dieta isenta de glúten promove a perda de peso, embora não haja nenhuma evidência científica que o demonstre. Por outro lado, porque o número de doentes celíacos diagnosticados tem aumentado, este mercado segmentado é importante para os ajudar a seguir uma dieta restrita e exigente, tornando-se este um problema socioeconómico. Apesar deste crescimento, os produtos GF ainda são difíceis de encontrar devido ao seu preço elevado, variedade limitada e propriedades sensoriais que deixam a desejar quando comparados com alimentos equivalentes, mas com glúten (Hager e Arendt, 2013; Capriles *et al.*, 2016).

A ausência de glúten em produtos de panificação resulta em defeitos na aptidão tecnológica, características nutricionais e aceitação do consumidor. A ausência da farinha de trigo nestes produtos e consequente ausência de glúten, que confere propriedades viscoelásticas, resulta numa baixa retenção de gás e formação de uma estrutura menos elástica, sendo os pães GF produtos com pequeno volume e miolo compacto quando comparados com produtos à base de trigo. Assim, a investigação e desenvolvimento de novos produtos GF de elevada qualidade nutricional, tecnológica e sensorial, como o aroma, textura e sabor, representam um desafio para a indústria de cereais (Capriles *et al.*, 2016; Naqash *et al.*, 2017).

Muito se tem inovado em formulações de pão sem glúten (GFB), resultando em variadas publicações científicas, produtos alternativos e um maior conhecimento de toda a comunidade. As formulações dos GFB variam utilizando-se farinhas sem glúten (arroz, milho, sorgo), pseudocereais (amaranto, quinoa e trigo sarraceno), farinhas de leguminosas (soja, grão de bico, ervilha), amidos/féculas (batata, milho, mandioca) e outros ingredientes como hidrocolóides, emulsionantes e lubrificantes, que isolados ou em combinação, têm como objetivo aumentar as propriedades tecnológicas, nutricionais e sensoriais, ao mesmo tempo que levam a um aumento do tempo de prateleira e do preço do produto final (Ahmad *et al.* 2016).

O pão sem glúten é deficiente na retenção de gás, com massas pegajosas, pouco coesas e com baixa elasticidade, resultando num pão com pequeno volume, com textura desintegrada, cores claras, reduzida porosidade e defeitos pós-cozedura. Os produtos finais são geralmente deficientes no aminoácido lisina, têm um teor demasiado elevado em hidratos de carbono e gorduras e, em contrapartida, teor demasiado baixo de proteína. Os produtos isentos de glúten têm duas vezes mais gordura, a maior parte saturada, quando comparados com outros produtos equivalentes com glúten. Os níveis de vitaminas, especialmente do grupo B, e minerais, como o ferro, estão em níveis muito baixos em produtos GF (Capriles *et al.*, 2016).

1.1.3.1. Farinhas e amidos

O amido é a primeira fonte de energia armazenada na maior parte das plantas, incluindo cereais, leguminosas e tubérculos, e fornece 70-80% das calorias consumidas pelo ser humano, em todo o mundo. Para além do seu valor calórico, é muito utilizado para conferir textura, uma vez que é usado como agente de gelatinização e espessante, conferindo humidade, estabilidade e ajudando a prevenir perdas de água. Nos produtos isentos de glúten,

o amido é incorporado para dar uma ou mais destas propriedades, dependendo, no entanto, da interação com os outros ingredientes da formulação e do tipo de produto. Os pães sem glúten são ricos em amido, tendo a gelatinização um efeito importante na qualidade do pão, uma vez que durante a cozedura os grânulos de amido gelatinizam e contribuem para a retenção do gás formado durante o processo de fermentação. Para que a gelatinização do amido ocorra eficientemente, a água presente deve estar em quantidade suficiente, daí a semelhança das massas sem glúten com massas de bolos. Nas fases iniciais de panificação, o amido pode contribuir significativamente para a consistência da massa (K. Wang et al. 2017).

As maiores fontes de amido são o milho, mandioca, batata, trigo e batata doce, sendo que os mais utilizados para formulação de novos produtos são o milho, mandioca, batata e arroz (Horstmann *et al.*, 2017).

A farinha de arroz é uma das farinhas mais utilizadas para preparar produtos isentos de glúten. A escolha desta farinha tem como base as propriedades benéficas que confere ao produto, desde a cor e ausência de sabor, sendo também hipoalérgica. No entanto, esta tem teores muito baixos de proteína, sódio, gordura e fibra, e um teor muito elevado em hidratos de carbono facilmente digeríveis. Tem um teor em prolaminas muito baixo, 2,5-3,5%, logo é necessário adicionar uma goma, emulsionante ou enzimas, que juntos confirmam uma viscoelasticidade desejada à mistura. Muitas combinações têm sido feitas, desde a combinação de fécula de batata com farinha de arroz; goma guar, hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e carboximetilcelulose com fécula de batata e farinha de arroz; fécula de batata, farinha de arroz, leite em pó e HPMC (Demirkesen et al. 2010).

1.1.3.2. Hidrocolóides

A aplicação de hidrocolóides ou gomas é uma alternativa promissora para aumentar a qualidade dos pães GF. Os mais utilizados são a goma guar, goma xantana e hidroxipropilmetilcelulose (HPMC).

Os hidrocolóides consistem em polissacáridos ou proteínas solúveis em água com estruturas químicas variadas que conferem uma variedade de propriedades funcionais. São usados como agentes de estrutura para mimetizar as propriedades viscoelásticas do glúten, característica que faz com que seja um ingrediente desejado na indústria panificadora. (Ahmad et al. 2016)

A qualidade do pão sem glúten é influenciada pela natureza, teor e propriedades dos hidrocolóides, que vão aumentar a estabilidade da massa, aumentando a viscosidade da

matriz líquida devido à coalescência entre as bolhas de gás. Todos os hidrocolóides interagem com a água reduzindo a difusão desta, aumentando a estabilidade devido a pontes de hidrogênio e ligações intra e intermoleculares. A capacidade de ligação da água afeta a textura, uma vez que os hidrocolóides ligam as moléculas de água e aumentam a plasticidade dos componentes alimentares. Também podem afetar a formação de cristais de gelo bem como o seu crescimento, influenciando a textura dos pães congelados (Ahmad et al. 2016).

O efeito do hidrocolóide nas propriedades do pão ou na massa depende da estrutura química, quantidade usada, interação com outros ingredientes e parâmetros do processo (Ahmad et al. 2016).

Em adição aos hidrocolóides, os emulsionantes são muito usados, uma vez que auxiliam na mistura e emulsionam os ingredientes, de forma a conseguir gerar interação entre componentes da farinha e outros ingredientes presentes na mistura, de forma a obter um miolo mais macio, melhorar a textura e permitir a retenção de CO₂ (Demirkesen et al. 2010).

1.1.3.2.1. Hidroxipropilmetilcelulose (HPMC)

O Hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) é uma celulose obtida a partir de estirpes de material vegetal fibroso. Em primeiro lugar a celulose é parcialmente esterificada com grupos metilo e com grupos hidroxipropilo de substituição, em menor quantidade. Posteriormente, já sob forma de metilcelulose é modificado por tratamento com óxido de alcali e propileno, favorecendo a ligação de alguns grupos 2-hidroxipropilo, através de ligações éter, às unidades anidrogucose da celulose, com a fórmula química da *Figura 3* (FAO 2011).

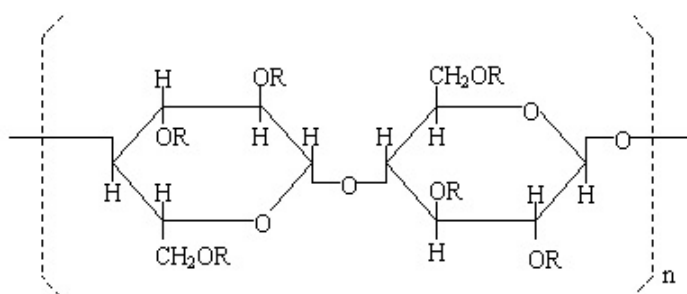


Figura 3 - Fórmula de estrutura de HPMC. Denominação química: éter-2-hidroxipropílico de metilcelulose.

Fonte: <http://www.yitengchem.cn/en/index.php?c=content&a=list&catid=177>

Após terem sido definidas especificações para identidade e pureza, bem como emitidos pareceres sobre o HPMC, denominado também E 464, pelo Comité Conjunto de Especialistas da FAO/OMS sobre Aditivos Alimentares (JECFA) e pelo Comité Científico da Alimentação Humana (SCF), estabeleceram-se especificações, que ainda hoje são as que estão em vigor, no Regulamento (UE) nº231/2012 da Comissão, de 9 de Março de 2012, que estabelece assim especificações para os aditivos alimentares enumerados nos anexos II e III do Regulamento (CE) nº 1333/2008. Neste é mencionado que um dos critérios de pureza é a quantidade de propilenocloridrina (PCH), um dos resíduos formados durante a modificação da celulose por hidroxipropilação, sendo que o seu limite é “não superior a 0,1 mg/kg”.

No entanto, em 2011, o JECFA tentou aumentar os níveis específicos para “não mais que 1,0mg/kg”, devido ao desenvolvimento de um novo método analítico e porque considerou que os níveis de PCH não eram tóxicos. O painel científico da EFSA e a União Europeia, não concordam no entanto com esta mudança, sendo que não suportaram a mudança de 0,1 para 1 mg, continuando o “não superior a 0,1mg/kg” o estabelecido (EFSA 2015).

O HPMC tem benefícios não só a nível tecnológico, uma vez que melhora a retenção de gás e absorção de água na massa sem glúten, aumentando ainda o teor de humidade do miolo e volume de pão, reduzindo a velocidade de endurecimento e melhorando a textura e propriedades sensoriais, mas também a nível de saúde para o organismo humano (Hager e Arendt, 2013).

No Regulamento (UE) nº 432/2012 da Comissão, de 16 de Maio de 2012, é estabelecido que o HPMC tem duas alegações de saúde: alegação 814 e 815. Na primeira é mencionado que o consumo deste hidrocolóide, para alimentos que contenham 4g por porção quantificada, juntamente com a refeição contribui para um menor aumento de glicose no sangue após essa mesma refeição. Já na alegação 815 é mencionado que este hidrocolóide, para alimentos que proporcionem uma ingestão diária de 5g do mesmo, contribui para a manutenção de níveis normais de colesterol no sangue.

1.1.3.3. Outros ingredientes

Para além dos ingredientes mais conhecidos como farinhas alternativas, amidos ou hidrocolóides, muitas têm sido as alternativas propostas para o desenvolvimento de pães isentos de glúten. O que todos os novos ingredientes têm em comum é o desenvolvimento de produtos com melhores características físicas e sensoriais, bem como nutricionais, contudo a tentativa de melhorar algumas características pode levar a algumas limitações tecnológicas

que podem mudar a cor, textura, aroma e assim influenciar a aceitação do consumidor (Capriles *et al.*, 2016).

Uma das novas alternativas passa pelo uso de pseudocereais, como amaranto, trigo sarraceno ou farinha de quinoa que podem ser introduzidos numa formulação misturados com farinha de arroz e fécula de batata. Estes pseudocereais aumentam o teor em proteína, fibra, cálcio, ferro, vitamina E e antioxidantes, para além que o produto final tem uma textura mais macia e uma crosta e miolo mais escuros, bem como uma maior capacidade de retenção da água (Alvarez-Jubete *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2017).

As leguminosas como a soja e o grão de bico têm sido estudadas. Estima-se que consigam aumentar o teor em proteína em 8% e ser uma boa fonte de minerais (Minarro *et al.* 2012). Sementes como a chia, que usadas sob forma de farinha, podem aumentar o teor em proteína, lípidos, cinza, ácido α -linoleico e compostos fenólicos, bem com capacidade antioxidante. O mesmo se pode dizer da castanha e alfarroba, que sob forma de farinha, têm sido estudadas em diferentes percentagens, usando como controlo a farinha de arroz (Steffolani *et al.* 2014).

Nos ingredientes de origem vegetal e com origem em produtos de fruta, tais como sumos de uvas, extratos de polpa de kiwi, polpa de laranja e subprodutos de morango e sementes de groselha preta, tem ocorrido uma grande aceitação devido a uma composição nutricional mais enriquecida que outros produtos isentos de glúten (Sabanis *et al.*, 2008; Sun-Waterhouse *et al.*, 2009; Korus *et al.*, 2011; O'Shea *et al.*, 2013).

As proteínas podem ser adicionadas sob forma de lacticínios, ovos, leguminosas e cereais. Estas são utilizadas para construir uma matriz que consegue mimetizar as propriedades do glúten, melhorando as características reológicas das massas, bem como as propriedades sensoriais, devido às reações de *Maillard*, que conferem um aumento de sabor e cor, e ainda do tempo de prateleira dos pães (Capriles e Arêas, 2014).

Menos utilizadas têm sido as enzimas e as bactérias. As enzimas são utilizadas com o objetivo de melhorar a qualidade do produto final e tempo de prateleira, sendo que o seu principal mecanismo de atuação corresponde à hidrólise de ligações peptídicas. São usadas enzimas modificadas como amílases e ciclodextrinas glicosiltransferases, bem como enzimas de ligação cruzada como transglutaminase, glucose oxidase, tirosinase, lacase e protease. Já em relação aos microrganismos tem-se estudado a utilização de *Bacillus firmus* e bactérias ácido-lácticas como *Lactobacillus* com o objetivo de produzir produtos finas com uma textura mais crocante, maior volume e maior aceitação a nível sensorial por parte do consumidor (K. Wang *et al.* 2017).

1.2. Microalgas

As microalgas podem ser consideradas um ingrediente inovador e promissor, rico em nutrientes com elevados teores de proteína, ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa, carotenoides, vitaminas, minerais e compostos fenólicos, a par de outros compostos bioativos. Já existem empresas interessadas no sector, como é o caso de Terravia (Estados Unidos da América), produtora de isolados proteicos e óleos de culinária com adição de microalgas; Dulcesol (Espanha), líder em produtos de panificação e pastelaria, que investiram numa linha de produção com produtos de panificação com adição de *Chlorella*. Mas estas não são as únicas empresas interessadas neste mercado, estimando-se que vá atingir os 44,7 mil milhões de dólares até 2023, com uma taxa de crescimento de mais de 5% no período de 2016-2023 (Batista et al. 2017).

O mercado de alimentos funcionais, utilizando microalgas em massas, pães, iogurtes e bebidas, apresenta rápido desenvolvimento em países como França, Alemanha, Estados Unidos da América, China e Tailândia, os três primeiros devido aos conhecimentos científicos e avanços tecnológicos e, os dois últimos devido ao tipo de produtos que a cozinha local apresenta, não sendo propriamente uma novidade o uso de algas no mercado asiático (Figueira et al. 2011).

A Europa por sua vez, ainda se encontra pouco recetiva a este mercado, uma vez que em muito contrasta com a gastronomia tradicional e a história do país e consequentemente dos consumidores. No entanto, não é só devido ao consumidor que a Europa tem tido mais dificuldade a entrar no sector de microalgas quando comparada, por exemplo, com países asiáticos. Estas dificuldades estão relacionadas com o cultivo e os elevados custos de produção, pouca procura dos mercados e uma legislação muito restritiva no que diz respeito aos novos produtos (Batista et al. 2017).

Com o objetivo de mudar o paradigma, ao mesmo tempo que se oferecem novas alternativas a nichos de mercado, como por exemplo, os doentes celíacos, novos produtos têm surgido, muitas vezes reinventados tendo como base a cozinha tradicional. Produtos como a maionese, molhos de saladas, pudins, bolachas, massas alimentícias e pão têm visto ser adicionadas microalgas para lhes conferirem alguma cor e atributos funcionais, tornando os produtos o mais atrativos sensorialmente e o mais saudável possível (Batista et al. 2013; L Gouveia et al. 2008). Esta nova abordagem saudável tem ainda sido explorada por *chefs* ou pessoas ligadas diretamente à gastronomia, que as incluem nos seus pratos, muitas vezes

em combinações inesperadas e deliciosas. Na maior parte dos supermercados também já se torna fácil de encontrá-las, sob forma desidratada.

O uso de ingredientes que conferem propriedades funcionais e benefícios específicos para a saúde, devido ao teor em nutrientes já conhecidos, é uma maneira atrativa de desenvolver novos produtos alimentares, com um nicho de mercado com um crescimento pronunciado. Os doentes celíacos apresentam muitas restrições a nível alimentar, sendo que para além de se restringirem a um número de ingredientes menor devem também ter em atenção se os produtos escolhidos conseguem satisfazer as necessidades nutricionais. Os produtos sem glúten têm normalmente um teor em proteína mais baixo, pouca estrutura e elevados teores de hidratos de carbono e gorduras.

Assim é necessário arranjar uma solução que lhes consiga providenciar todos os nutrientes que se encontram em falta.

As microalgas têm recebido muita atenção como uma das fontes mais promissoras de compostos com atividade biológica que podem ser utilizados como ingredientes funcionais. A sua composição química equilibrada, rica em proteínas, perfil de PUFA, vitaminas, antioxidantes e minerais, e os seus atributos a nível tecnológico fazem com que sejam aplicáveis para desenvolvimento de novos produtos (García-Segovia et al. 2017). Para originar um produto com as características ideais, deve-se ter em conta as espécies de microalga e o seu perfil nutricional, que deve ser o mais equilibrado possível, bem como a caracterização físico-química.

As microalgas são conhecidas como sendo uma excelente fonte de cor, funcionando como um corante natural. Esta função pode ser muito explorada, porque a maior parte dos corantes presentes no mercado não são de origem natural, e podem causar reações alérgicas e intolerâncias. Os pigmentos utilizados estão relacionados com os pigmentos maioritários presentes nas microalgas, microalgas com maior predominância de clorofila conferem a cor verde enquanto microalgas com maior predominância em β -carotenos conferem cores que vão desde o vermelho ao amarelo. A utilização de carotenoides extraídos das microalgas para produtos alimentares também tem tido como objetivo o aumento dos teores de vitamina A (Batista et al. 2013; Pulz and Gross 2004).

O teor elevado em proteína na maior parte das espécies é uma das principais razões para a sua adição em novos produtos, que tenham uma deficiência neste teor, como é o caso de produtos GF. Figueira et al. (2011) estudaram a incorporação de *Spirulina platensis* em GFB e concluíram que a adição desta cianobactéria levou a um aumento significativo no teor de

proteína presente. A nova formulação permitiu ainda observar que neste tipo de produtos, ocorre uma redução de lípidos e hidratos de carbono e um aumento significativo na concentração de aminoácidos essenciais como a treonina, metionina, isoleucina e leucina. O pão resultante era assim baixo em calorias, enriquecido nutricionalmente e isento de colesterol.

As microalgas funcionam ainda como agentes de estrutura. (Luísa Gouveia et al. 2007; Batista et al. 2017) estudaram a incorporação de *Chlorella vulgaris* em biscoitos e incorporação de diferentes microalgas em bolachas, respetivamente, e concluíram que a firmeza dos mesmos aumentou linear e significativamente com a adição de microalgas, quando comparados com o controlo. A função de estrutura está intimamente relacionada com o teor proteico, uma vez que o elevado teor em proteína reforça a estrutura da massa, tal como verificado num trabalho anterior de (Graça et al. 2018) que estudou a incorporação de *Chlorella vulgaris* em pão de trigo.

Apenas as plantas são capazes de sintetizar PUFA, no entanto, as microalgas são a base de cadeias alimentares inteiras. Para além de serem uma fonte primária neste tipo de componentes, estes ácidos gordos têm vantagens como o facto de não possuírem odores desagradáveis, reduzirem o risco de contaminação química e atingirem melhores potenciais de purificação. Os PUFA extraídos das microalgas têm um mercado promissor, uma vez que já se produziram leites infantis com adição de PUFA purificados de microalgas, e também ovos “OMEGA”. O teor em EPA e DHA das microalgas também tem sido aproveitado para desenvolvimento de produtos destinados a lactentes (Pulz e Gross, 2004).

1.2.1. *Tetraselmis chuii*

A *Tetraselmis chuii* (Figura 4) é uma microalga verde unicelular marinha, de 10 a 15 μm de tamanho e formato elipsoidal. É capaz de se mover, uma vez que é tetra – flagelada e a sua reprodução ocorre por fissão longitudinal.

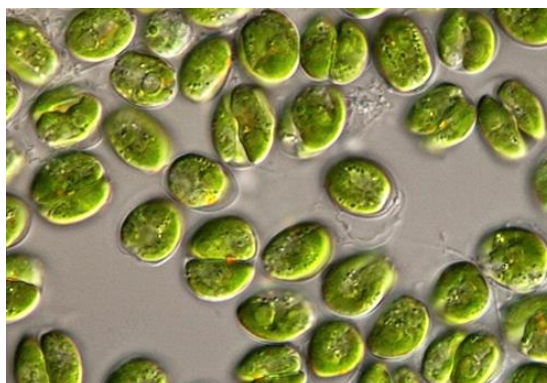


Figura 4 - *Tetraselmis chuii* (vista microscópica). Fonte: (UTEX, 2018)

Esta microalga pertence ao Reino – *Plantae*; Filo – *Chlorophyta*; Classe – *Prasinophyceae*; Ordem – *Chlorodendrales*; Família – *Chlorodendraceae*; Género – *Tetraselmis* (Butcher 1959).

A *Tetraselmis sp.* é ideal para cultura uma vez que aguenta condições extremas de pH, temperatura, salinidade e luz, que afetam diretamente o seu crescimento. A *Tetraselmis chuii* tem sido aplicada em aquacultura e para a biorrefinaria, devido à sua constituição em PUFA de cadeia longa, especialmente os ácidos eicosapentaenóicos (EPA). Para além disso, tem sido muito estudado a sua incorporação em alimentos e bebidas e também produtos nutracêuticos, uma vez que esta é rica em proteínas, lípidos e hidratos de carbono, e contém ainda compostos bioativos como vitamina E e carotenoides, que lhe conferem um elevado poder antioxidante (Mohammadi *et al.*, 2015; Bonilla-Ahumada *et al.*, 2018).

A utilização de *Tetraselmis chuii* foi aprovada, segundo o *Regulamento de Execução (UE) 2017/2470* para incorporação em molhos (níveis máximos 250 mg/dia), sais especiais (níveis máximos 1%), condimentos (níveis máximos 250 mg/dia) e suplementos alimentares, tal como definidos na Diretiva 2002/46/CE (níveis máximos 250 mg/dia), devendo estar rotulada como “liofilizado de microalga *Tetraselmis chuii*”.

1.2.2. Impacto do processamento nas propriedades físico-químicas das microalgas

Hoje em dia, os alimentos processados requerem estabilidade e segurança. Cada vez mais se tem dado ênfase à rotulagem, elevada qualidade e alimentos de valor acrescentado para uso do dia a dia. Estas melhorias, na qualidade e segurança, têm sido conseguidas através de requisitos regulamentares nas indústrias, bem como uma legislação nacional e internacional que recomenda e/ou impõe padrões de desempenho ou métodos para atingir a segurança e qualidade (Awuah *et al.*, 2007).

O tratamento térmico permanece como um dos métodos, em escala industrial, mais usados para preservar e aumentar o tempo de prateleira dos alimentos. Este foi estabelecido com base em dois fatores: resistência ao calor de microrganismos para cada formulação ou composição específica de produto, e binómio tempo/temperatura do produto específico.

Dependendo da intensidade do calor aplicado (temperatura e tempo de exposição), os tratamentos térmicos podem ser classificados em esterilização ou pasteurização. A esterilização é caracterizada por ser um processo onde se aplicam elevadas temperaturas durante geralmente um curto período de tempo, visando a redução total dos microrganismos,

enquanto que a pasteurização é um processo onde são aplicadas temperaturas inferiores a 100°C durante um longo período de tempo, visando eliminar microrganismos alvo. Ambos são métodos bastante importantes para preservação de produto, com consequente aumento do tempo de prateleira do mesmo. Este tipo de tratamentos, no entanto, influencia no teor de nutrientes e características sensoriais, sendo que em alguns frutos, a pasteurização é responsável pela diminuição dos níveis de vitamina A, compostos fenólicos, carotenoides totais e ácido ascórbico (vitamina C) (Liaotrakoon et al. 2013). O tratamento térmico pode levar à perda de nutrientes e características sensoriais como o aspeto, cor, sabor e textura. No entanto, o processamento térmico nem sempre é negativo, sendo muitas vezes usado para danificar a parede celular, tornando os compostos de interesse mais acessíveis, como é caso de compostos bioativos (Barba et al. 2017).

A desidratação, uma operação de remoção de água que envolve aumento de temperatura, permite um aumento do tempo de prateleira, bem como uma redução no volume da matriz. Para além disso, afeta a presença e estabilidade dos compostos bioativos como o ácido ascórbico, polifenóis e carotenoides (Rawson et al. 2011).

A liofilização é um dos métodos de desidratação mais utilizados e o método que permite a obtenção de produtos finais com elevada qualidade. Este método permite a remoção de água do produto através de processo de sublimação. Este processo requer baixas temperaturas, logo reações de deterioração e atividade microbológica têm uma probabilidade muito baixa de ocorrer, daí os produtos obtidos serem de elevada qualidade e de variadas matrizes, desde alimentos, como carne, cafés, frutos e vegetais, sendo agora o método preferido para microalgas, medicamentos como a penicilina, hormonas e vitaminas. Estes possuem um tempo de prateleira longo, sendo que um produto com 2% de mistura residual possui um tempo de prateleira de 2 anos, e a manutenção da forma inicial, com uma redução mínima do volume (Ratti 2012). Apesar de todas as vantagens, o processo de liofilização foi reconhecido como sendo o processo de desidratação mais dispendioso, uma vez que a secagem durante um período de tempo elevado em vácuo contínuo, aumenta os níveis de consumo de energia, para, consequentemente, necessitar de manutenção contínua (Ratti 2012).

A degradação de compostos bioativos é muito dependente do tipo de tratamento aplicado. A oxidação dos compostos bioativos, que ocorre durante o processamento e gera a sua degradação é necessária para evitar perdas, podendo criar implicações na saúde humana. As vitaminas são os componentes mais sensíveis presentes nas matrizes alimentares e podem ser afetadas por processos de esterilização. A degradação das vitaminas durante o

tratamento térmico não é um processo simples e é dependente de outros agentes como é o caso do oxigénio, luz e solubilidade em água. A degradação depende ainda do pH e pode ser catalisada por químicos presentes, metais, outras vitaminas e enzimas. Nas vitaminas sensíveis ao calor como é o caso da Vitamina A, a sua degradação ocorre na presença de oxigénio. Já a Vitamina D, E e β -carotenos, vitamina C, vitaminas do complexo B sofrem degradação em ambientes acídicos (Awuah *et al.*, 2007; Rawson *et al.*, 2011).

A cor é uma das alterações que influencia a aceitação do consumidor. Os pigmentos naturais da matriz alimentar são suscetíveis a mudanças ou degradações devido ao calor, daí serem as mais afetadas, durante processos de pasteurização. As clorofilas são convertidas em pirofeofitinas, enquanto as antocianinas, carotenoides e betaninas, sofrem isomerização, sendo que, os isómeros resultantes têm menos intensidade de cor, no entanto, possuem maior capacidade antioxidante, levando a um aumento da atividade antioxidante na matriz alimentar onde estão presentes. As antocianinas, responsáveis por conferir inúmeras cores desde o amarelo ao roxo, quando modificadas pelo calor passam a conferir cor acastanhada (Awuah *et al.*, 2007; Rawson *et al.*, 2011).

O teor em proteínas também pode ser alterado durante o tratamento térmico, sendo que o efeito do tratamento térmico à matriz pode ser dividido em: responsável por alterar a estrutura secundária, terciária e quaternária ou responsável por alterar a estrutura primária. Quando ocorre a quebra da estrutura secundária, terciária e quaternária as proteínas são mais expostas, devido a processos de desenrolamento, melhorando a sua biodisponibilidade, uma vez que as ligações peptídicas tornam-se facilmente acessíveis a enzimas digestivas. As modificações na estrutura primária podem levar a uma menor digestão e produzir proteínas que não estão biologicamente disponíveis. A menor digestão resulta da complexidade da estrutura primária devido ao número diferenciado de ligações que a constituem. (Awuah *et al.*, 2007).

Todos os tratamentos térmicos podem levar ainda a que ocorram reações de *Maillard*, que são uma série de reações complexas entre aminoácidos e açúcares redutores. As reações de *Maillard* são caracterizadas por dar origem a soluções incolores, mas depois, devido a inúmeras reações, compostos denominados melanoidinas, de cor castanha ou preto, insolúvel, é formado. Estas reações levam a mudanças no sabor e mudanças a nível nutricional, uma vez que as matrizes foram comprometidas pelo danos nas proteínas e perdas em aminoácidos (Awuah *et al.*, 2007).

1.2.3. Disrupção

As microalgas são uma fonte de compostos bioativos, no entanto, estes encontram-se na sua maior parte encapsulados e protegidos pelas paredes complexas destes organismos. Os componentes mais comuns das paredes celulares, que reagem às mudanças de condições de crescimento, são os lípidos, celulose, proteína, glicoproteínas e polissacáridos, sendo que entre estes componentes existe uma matriz microfibrilar gel-proteína. Algumas microalgas podem ainda estar protegidas por componentes inorgânicos rígidos como a sílica ou carbonato de cálcio (S. Y. Lee et al. 2017).

Como forma de aproveitar ao máximo os compostos bioativos, que são de grande valor em diferentes áreas, começou-se a considerar a hipótese de submeter a biomassa a um pré-tratamento que permitisse uma libertação controlada destes compostos ativos, tratamento esse designado por disrupção celular controlada. A disrupção celular controlada pode ser feita em diferentes níveis, conseguidos por operações de purificação, liofilização ou atomização. Também podem ser realizados métodos específicos, como a homogeneização a altas pressões ou micro-ondas, tudo isto tendo em conta a utilização e o tipo de tecnologia onde o produto resultante vai ser aplicado, bem como a estrutura da parede celular, o tamanho e a forma da alga.

Estudos recentes mostram que as microalgas e produtos resultantes das mesmas podem ser usados em alimentos e bebidas, bem como produtos nutracêuticos e farmacêuticos. Nesses estudos, verificou-se que algumas espécies de microalgas podem afetar as propriedades estruturais dos produtos alimentares quando submetidas a condições extremas como elevadas pressões e temperaturas. Assim durante todo o processo pretende-se idealmente que todos os componentes intracelulares sejam libertados, sem degradação (Raymundo *et al.*, 2019).

1.2.4. Métodos de disrupção celular

Diferentes métodos de disrupção celular podem ser utilizados, alguns podem mesmo ser utilizados em combinação, no entanto, não há um método ótimo com elevada produtividade. Para selecionar o melhor método há que ter em conta muitos fatores, como rendimento, custo, qualidade e bioatividade, bem como fatores ambientais como poluição e resíduos gerados.

Assim os métodos podem ser divididos em mecânicos e não mecânicos, sendo que nos métodos não mecânicos encontram-se os métodos físicos, químicos e enzimáticos. Os métodos químicos podem influenciar a qualidade dos produtos resultantes, devido à formação de produtos secundários, e também devido à libertação de uma fração que pode solubilizar e

degradar componentes presentes na biomassa, durante o pré-tratamento aplicado. Já os métodos onde enzimas são utilizadas têm uma elevada qualidade, no entanto, têm muitos custos envolvidos e os agentes de oxidação utilizados podem promover a oxidação de componentes de interesse, sensíveis a essa reação. Os métodos físicos são os preferidos na maior parte das vezes, porque evitam as contaminações químicas dos bioprodutos e preservam o material intracelular que tem compostos de interesse. Os métodos mecânicos são os mais utilizados, porque são os menos dependentes das espécies de microalgas em estudo, são menos propensos a contaminações, têm melhores rendimentos e fácil controlo e aumento em larga escala, no entanto, estes métodos têm como desvantagem a necessidade de grandes introduções de energia, quando comparados com os outros métodos descritos (Lee *et al.*, 2012; Raymundo *et al.*, 2019).

Para extração dos produtos das microalgas os processos mecânicos mais utilizados são o moinho de esferas, a homogeneização a altas pressões, irradiação micro-ondas e ultrassonicação. Os métodos de moinho de esferas e homogeneização a altas pressões podem ser feitos em combinação, no entanto, são menos favoráveis que processos realizados a temperaturas entre os 50 e 100°C. Já as micro-ondas e os ultrassons reduzem o tempo de processo, aumentam o rendimento e também a qualidade do extrato, na maior parte das vezes, no entanto, podem levar à degradação dos componentes e a um aumento da temperatura com custos operacionais adicionais, respetivamente (Raymundo *et al.*, 2019).

O moinho de esferas, processo de disrupção utilizado na presente dissertação, é um processo que causa danos mecânicos diretos às células, e tem como principais vantagens, uma eficiência elevada de disrupção, alta capacidade de carregamento de biomassa, equipamento comercialmente disponível e operações que facilmente são colocadas em grande escala. É composto por um agitador rotativo, num repositório fixo cheio com pequenas esferas. A moagem é conseguida pela energia cinética conseguida pela colisão física das esferas sólidas contra as células, por tensão tangencial e em compressão. A eficiência da disrupção depende do tamanho e composição das esferas, da velocidade e forma do agitador, do tempo e características da suspensão, como viscosidade e concentração. A energia transferida do eixo rotativo às esferas e a energia de conversão em calor devido ao atrito vai levar a um aumento da temperatura. As configurações mais recentes possibilitam, no entanto, um controlo da temperatura, uma vez que a câmara de moagem está equipada com um sistema de arrefecimento (Lee *et al.*, 2012; Raymundo *et al.*, 2019).

O recurso ao moinho de esferas (Figura 5) permite que sejam aplicadas grandes quantidades de energia e condições de temperatura que variam entre os 50 e 100°C. A combinação entre a agitação, colisão e redução de dimensão produz uma disrupção mais eficiente que a homogeneização a altas pressões (Lee *et al.*, 2012; Raymundo *et al.*, 2019).

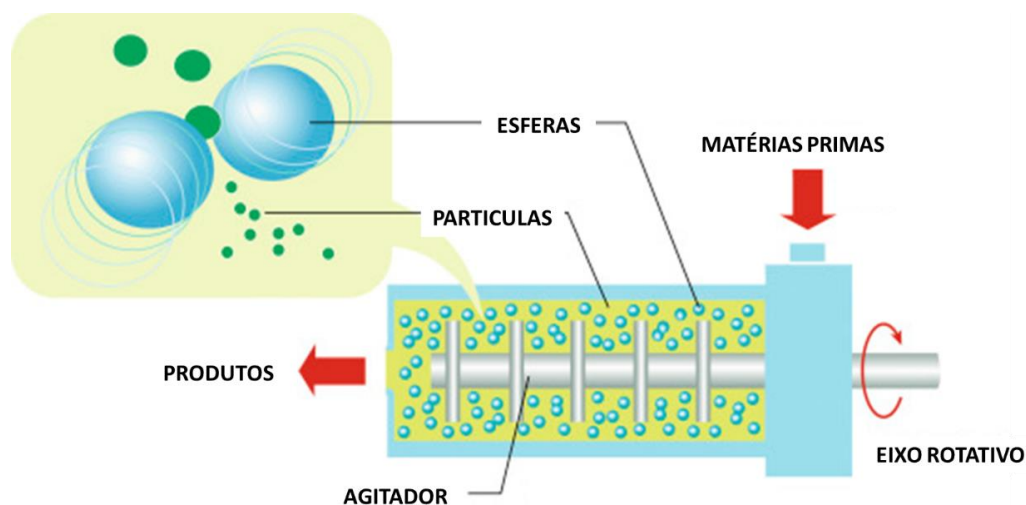


Figura 5 - Representação de funcionamento do método de moinho de esferas. Fonte: Adaptado de (Ishii 2018)

1.3. Antioxidantes

O stress oxidativo é resultado de um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e os mecanismos de defesa do organismo. Os radicais livres provocam assim alterações moleculares em diferentes espécies, podendo por isso estar na origem de várias doenças como cancro, doença de Alzheimer, doenças cardiovasculares, entre outras. O excesso de espécies reativas de oxigénio e de azoto levam ao desenvolvimento de lesões tecidulares, devido à libertação de citocinas e ativação de enzimas, que se forem corretamente inibidas podem ser um dos alvos da prevenção de doenças associadas ao stress oxidativo e inflamação (Delleau *et al.* 2013; Lobo *et al.* 2010).

Os antioxidantes são compostos de defesa do stress oxidativo, atuando como resposta metabólica à produção de radicais livres e espécies oxidantes. Estes compostos são estáveis e doam um eletrão a um radical livre neutralizando-o e reduzindo a capacidade do mesmo de provocar danos celulares. Assim, através de mecanismos de eliminação de radicais livres, os antioxidantes são capazes de atrasar ou inibir danos celulares (Lobo *et al.* 2010).

Os antioxidantes podem ser divididos em duas categorias: sintéticos e naturais. Os sintéticos são estruturas que contém compostos fenólicos com várias substituições alquila como são os casos do hidroxianisol butilado (BHA) e hidroxitolueno butilado (BHT). Já os naturais, são compostos que existem na sua forma natural na matriz analisada, e são variados

os seus exemplos: compostos fenólicos, compostos que contêm azoto (clorofilas, aminoácidos e aminas), carotenoides e ácido ascórbico (vitamina C) (Velioglu et al. 1998).

As frutas e vegetais podem ser uma boa fonte de antioxidantes naturais, sendo que contêm diferentes componentes com atividade. Estes conferem proteção contra radicais livres e estão associados a prevenção de doenças cardiovasculares, diabetes, cancro, entre outras. Hoje em dia, são conhecidos vários outros alimentos com atividade antioxidante como é o caso das microalgas. Na indústria alimentar, podem ainda ser usados como um grupo de aditivos, sendo capazes de proteger os alimentos das mudanças, a nível nutricional, que ocorrem durante os processos de oxidação, deterioração, rancificação, aumentando assim o seu tempo de prateleira (André et al. 2010).

1.3.1. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos estão muito presentes nos alimentos como frutas, vegetais, chocolate, café, vinho. Estes compostos, com um ou mais anéis aromáticos substituídos por um ou mais grupos hidroxilo, são os responsáveis não só pelas propriedades sensoriais, como também pela defesa contra espécies reativas de oxigénio. Quimicamente podem ser divididos em várias classes: ácidos fenólicos, flavonoides, antocianinas (Figura 6), isoflavonas, estilbenos, lignanas e polímeros fenólicos, também conhecidos como taninos (Figura 7). As propriedades organoléticas conferidas pelos compostos fenólicos são variadas, uma vez que cada tipo de composto fenólico é responsável por determinadas características. Por exemplo, as antocianinas, um dos principais grupos de compostos fenólicos são os responsáveis pelas cores laranja, vermelha, azul e roxa de alimentos como maçãs, cebolas e frutos vermelhos; já os taninos são um dos responsáveis pela adstringência dos vinhos (Dai and Mumper, 2010; Guimarães *et al.*, 2012; Machu *et al.*, 2015).

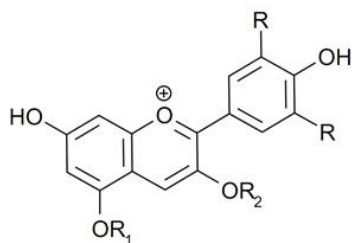


Figura 6 - Estrutura química de antocianinas. Fonte: Adaptado de (Guimarães *et al.*, 2012)

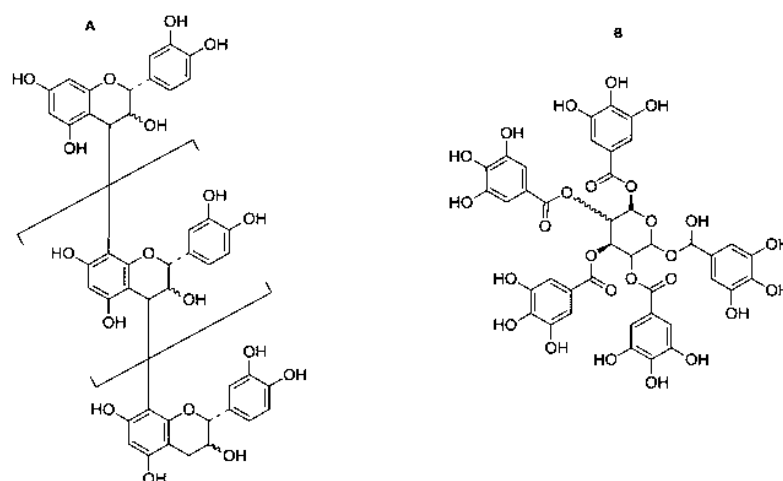


Figura 7 - Estrutura química de taninos: taninos condensados (A) e taninos hidrolisáveis (B).

Fonte: Adaptado de (Dias et al. 2014)

1.3.2. Vitamina E

A vitamina E pode-se designar através de oito diferentes compostos α , β , γ e δ tocoferóis e tocotrienóis. Os tocoferóis e tocotrienóis diferem na estrutura de acordo com o número e a localização de grupos substituintes no anel, no entanto, os mais abundantes são o γ e o α -tocoferol. O α -tocoferol remove o radical peróxido que se encontra no fim da cadeia. O poder antioxidante pode ainda incluir a doação de átomos de hidrogénio, penetração e movimento na membrana e a eficiência do radical tocoferoxil reciclar redutores citosólicos como o ascorbato (Fig.8) (Traber and Atkinson 2007).

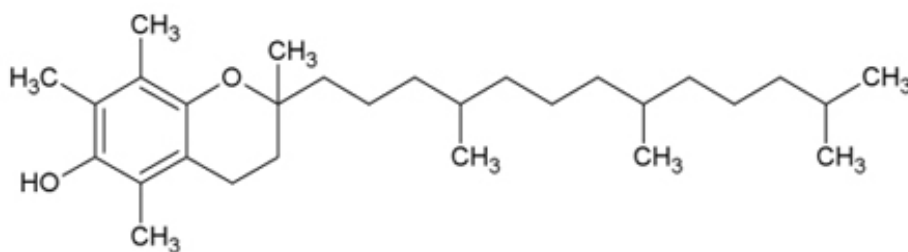


Figura 8 - Estrutura química do α -tocoferol (Vitamina E). Fonte: Adaptado de: <https://www.infoescola.com/bioquimica/vitamina-e/>

1.3.3. Pigmentos naturais

A clorofila é um tetrapirrol substituído com um átomo de magnésio na ligação central, coordenado por quatro átomos de azoto (Figura 9). O anel porfirínico é esterificado por um fitol, um álcool diterpénico. A clorofila pode estar sob variadas formas, no entanto, na natureza a clorofila a e b são as predominantes nas plantas enquanto a clorofila c, d e e são

encontradas em algas fotossintéticas e espécies diatómicas como as algas castanhas, vermelhas e amarelo esverdeadas

A distribuição da clorofila é dependente de inúmeros fatores como espécie, condições agroclimáticas, tratamento pré e pós colheita e o tipo de processamento que o alimento é sujeito. Estas estruturas são extremamente sensíveis a pH e temperatura, uma vez que as inúmeras variações que podem ocorrer nestes fatores, levam à formação de derivados distintos.

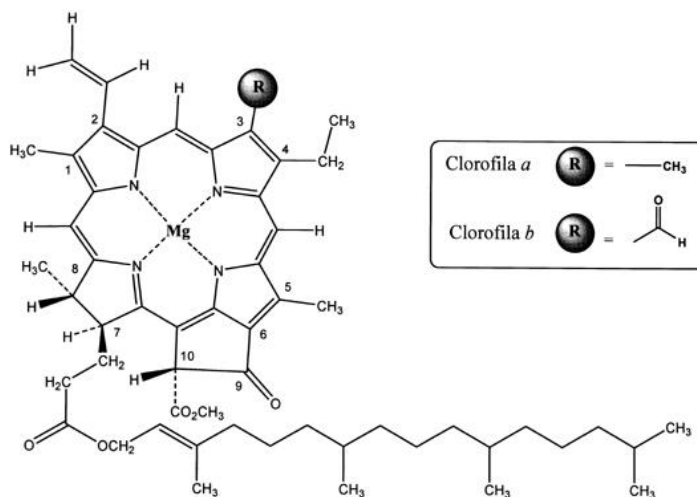


Figura 9 - Estrutura química da clorofila a e b. Fonte: Adaptado de: (Streit et al., 2005)

O principal papel da clorofila é absorver energia para a fotossíntese, consegue captar energia solar e transformá-la em energia química, e conferir a cor verde às plantas. No entanto, estudos comprovam que esta tem um potencial fisiológico e bioativo, estando relacionada com a prevenção de doenças crônicas e propriedades anti-inflamatórias. Este pigmento tem associação com outros pigmentos como os carotenoides e os pigmentos azul-esverdeados (Ferruzzi e Blakeslee, 2007).

Os carotenoides são agentes naturais de cor, ricos em vitaminas e com um elevado poder antioxidante. A sua capacidade antioxidante é conseguida por derivados mecanismos de ação: substituir um eletrão desemparelhado de um radical por outras moléculas ou por formação de um complexo com esses radicais. Os carotenoides são atrativos aos radicais uma vez que previnem que as moléculas excitadas de clorofila associadas transfiram os eletrões para o O₂, que pode gerar espécies reativas de oxigénio altamente destrutivas. Assim, o excesso de energia é dissipado como calor por conversão interna pelos carotenoides, minimizando assim o dano irreversível (Murthy et al. 2005). São ainda capazes de fortalecer o sistema imunitário, diminuir os riscos de doenças cardiovasculares e prevenir a degeneração das células. Os mais comuns são os β-carotenos (Figura 10), licopenos, luteínas e zeaxantinas, e a sua

presença é normalmente reconhecida pela cor que confere aos alimentos, num espectro que vai desde o amarelo ao vermelho (Bonilla-Ahumada *et al.*, 2018).

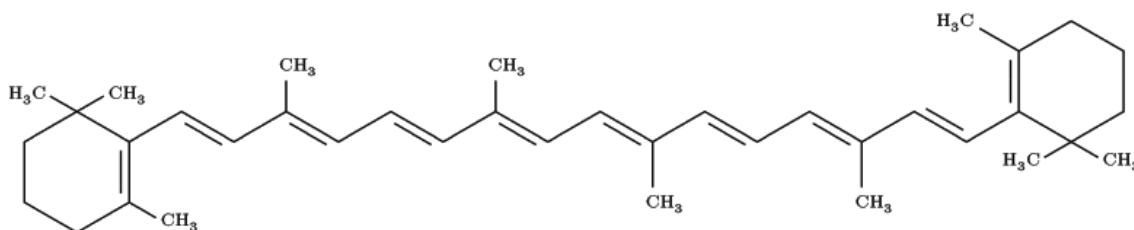


Figura 10 - Estrutura química do β - caroteno. Fonte: (World of Molecules, 2016)

1.3.4. Vitamina C

A vitamina C é o antioxidante solúvel em água mais importante, e encontra-se sob forma de ascorbato na forma ativa. O ascorbato pode sofrer oxidação reversível gerando diferentes compostos. É capaz de proteger os compostos que se localizam intracelular e extracelularmente na maior parte dos sistemas biológicos. Este poderoso antioxidante consegue ainda reduzir os radicais de tocoferóis, de forma a ativá-los, bem eliminar os radicais superóxido, oxigénio singuleto, peróxido de hidrogénio e os radicais hidroxilo (Klimczak *et al.* 2007).

O ácido ascórbico, *Figura 11*, tão regularmente chamado apenas por vitamina C, tem capacidade de doar eletrões a enzimas humanas, participando ainda na hidroxilação do colagénio, biossíntese de carnitina e biossíntese de hormonas (hidroxilação da dopamina e noradrenalina) e aminoácidos. Consegue ainda aumentar a biodisponibilidade do ferro, uma vez que o mantém na forma reduzida, estimulando a sua absorção (Klimczak *et al.* 2007).

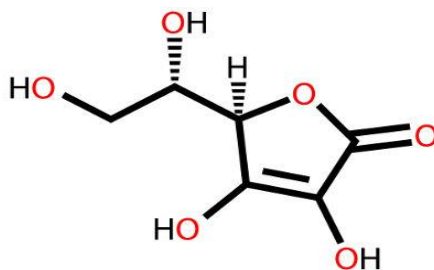


Figura 11 - Estrutura química do ácido ascórbico (Vitamina C). Fonte: (Manual da Química, 2019)

A sua importância está também relacionada com os benefícios que o seu consumo traz para a saúde humana: redução de risco de ataque cardíaco, derrames e cancro. A dose diária recomendada é de 100-120 mg/dia (Klimczak *et al.* 2007).

1.3.5. Os antioxidantes como fonte de compostos bioativos nas microalgas

As microalgas têm um elevado potencial quanto às áreas de aplicação: alimentação animal, aquacultura e alimentação humana, com desenvolvimento de novos produtos saudáveis. Estas possuem no geral, um elevado poder natural antioxidante, que poderá ser usado no futuro. Para essa utilização contribuem os fatores de cultivo, uma vez que estas ao serem cultivadas em biorreatores, a sua composição pode ser controlada, para que não contenham substâncias tóxicas ou quaisquer herbicidas ou pesticidas, podendo assim ser aumentada a purificação de compostos de interesse, que varia consoante a microalga produzida. Para além deste fator, ao serem produzidas em larga escala faz com que não sejam um recurso escasso (Li et al. 2007).

Estes organismos, na sua maioria unicelulares, têm uma elevada exposição ao oxigénio e radicais que provocam stress oxidativo, como tal desenvolveram sistemas eficientes de proteção contra as espécies reativas de oxigénio e radicais livres. Estes sistemas podem estar relacionados com captação de espécies reativas e radicais, mas também com a captação de metais pesados (L Gouveia et al. 2008).

Os antioxidantes são assim um conjunto de bioativos presentes nas microalgas, no entanto, nem todas as microalgas possuem o mesmo conjunto de compostos antioxidantes. A *Tetraselmis Shuii* é rica em vitamina E, clorofila e carotenoides, sendo estes os principais compostos que lhe conferem elevado poder antioxidante (Bonilla-Ahumada, Khandual e Lugo-Cervantes, 2018). Já a *Dunaliella salina* é capaz de acumular carotenoides em condições de stress, mais concretamente β -carotenos, que para além da sua atividade antioxidante possuem ainda a capacidade de ser um precursor de síntese de vitamina A (Murthy et al. 2005). *Chlorella vulgaris* por sua vez apresenta um poder antioxidante derivado dos pigmentos que possui (clorofila e carotenoides), vitamina C e vitamina E (Son et al. 2009). A *Spirulina platensis*, uma das mais conhecidas cianobactérias, tem como principais componentes que aumentam o seu poder antioxidante os compostos fenólicos, mais concretamente flavonoides, pigmentos (β -caroteno e produtos resultantes da degradação da clorofila), vitamina A e vitamina E (L. Wang et al. 2007).

1.4. **Metodologias**

1.4.1. Avaliação de antioxidantes

A quantificação de antioxidantes na indústria alimentar tem variadas dificuldades, sendo as principais, a extração incompleta de antioxidantes, a coextração com substâncias que

interferem na reação e não se conseguem isolar e a variedade que existe entre os diferentes compostos químicos, cada um com especificidade diferente de extração, consoante a solubilidade que possui. Estes problemas podem fazer com que os resultados das análises não correspondam aos resultados expectáveis. Devido a isso, é importante que quando se fazem medições da atividade antioxidante se utilizem pelo menos dois métodos, para se fazer uma comparação de resultados, possibilitando ainda a análise do tipo de compostos que conferem a atividade antioxidante registada (André et al. 2010; Guedes et al. 2013).

Uma variedade de métodos é utilizada para determinar a atividade antioxidante em alimentos: capacidade antioxidante medida em equivalentes Trolox (TEAC), capacidade de absorvência do radical oxigénio (ORAC), potencial antioxidante reativo total (TRAP), poder antioxidante pela redução do ião férrico (FRAP), capacidade antioxidante pela redução do ião cobre (CUPRAC), determinação da capacidade antioxidante total de compostos fenólicos pela reação de Folin - Ciocalteu (F-C) e captura do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) (Dai e Mumper, 2010; Gulçin, 2012).

Os métodos são classificados pela sua capacidade antioxidante em transferir átomos de hidrogénio (HAT) e/ou pela capacidade de transferência de eletrões (ET), sendo dependentes do pH. Os métodos HAT são os ORAC e TRAP e baseiam-se numa reação competitiva em que o antioxidante e substrato competem pelos radicais peroxil gerados pela decomposição dos compostos azotados. Já os métodos TEAC, F-C, FRAP e CUPRAC são métodos ET e têm como principal vantagem o facto de poderem ser aplicados em extratos com capacidade antioxidante de origem hidrofílica ou hidrofóbica, desde que o reagente seja solúvel em ambas as fases. Devido a esta vantagem, optou-se por utilizar neste trabalho os métodos F-C, FRAP e ainda DPPH, por serem os mais utilizados para extratos alimentares (Dai e Mumper, 2010).

1.4.1.1. FRAP

O método FRAP mede a capacidade dos antioxidantes reduzirem o complexo $[\text{Fe}^{3+}(\text{TPTZ})_2]^{3+}$ ao complexo $[\text{Fe}^{2+}(\text{TPTZ})_2]^{2+}$ em meio ácido. A redução é observada através da formação de produto corado (Figura 12). O pH do meio é uma das especificidades deste método, este deve ser 3,6 de forma a manter a solubilidade dos iões, uma vez que reações em pH mais baixo diminuem o potencial de ionização que condiciona consequentemente a transferência de eletrões e aumenta o potencial *redox*.

Este método é ainda dependente do tempo uma vez que para fenóis que reagem num curto período de tempo e quebram o anel aromático ou quebram os compostos com baixa ou diferentes reatividades, seria ideal que o método tivesse uma duração de reação menor. Já para alguns polifenóis que reagem mais lentamente e requerem uma reação longa para sua

consequente detecção, como é o caso do ácido cafeico, ácidos ferúlico, quercetina e ácido tânico, um método com duração maior seria o mais adequado. Assim sendo, existem diferentes metodologias com tempos de reação diferente, sendo mais adequado escolher um tempo de reação intermédio.

O FRAP é um método de transferência de eletrões, por isso, a sua combinação com outros métodos pode ser muito útil quando utilizada em paralelo com outras metodologias que contenham diferentes mecanismos de atuação. Este é um método muito utilizado em alimentos e bebidas, tendo sido já usado em chá, especiarias, vegetais (Gulçin 2012) .

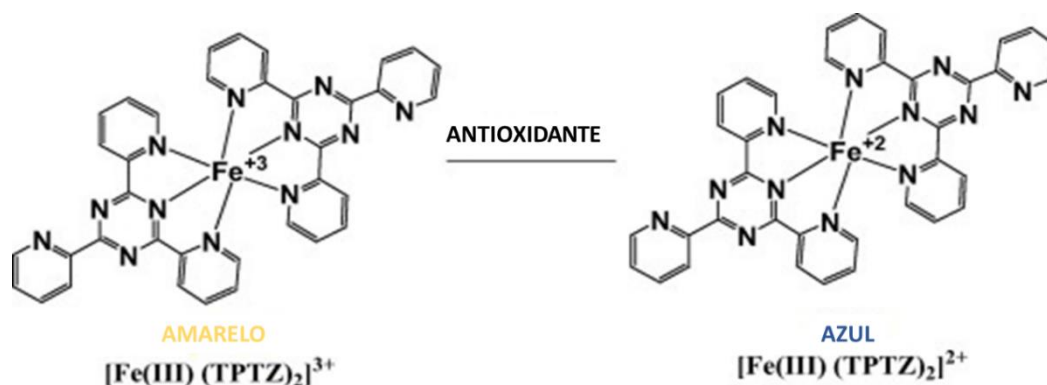


Figura 12 - Redução do complexo contendo Fe^{3+} ao complexo contendo Fe^{2+} - Método FRAP.
Fonte: Adaptado de (Gulçin 2012)

1.4.1.2. Capacidade redutora pelo método Folin – Ciocalteu – Determinação de fenóis totais

O método *Folin – Ciocalteu* é utilizado para determinação de compostos fenólicos totais, baseado na transferência de eletrões dos compostos fenólicos e espécies redutoras de molibdênio, que formam um complexo de cor azul, presentes no extrato em análise para o meio alcalino que contém Folin – Ciocalteu (Figura 13).

A reação em que se baseia o método, para além da transferência de eletrões entre anéis aromáticos, é a formação do óxido de molibdênio. Este é formado devido à reação de O_2^- , que resultou da oxidação dos compostos fenólicos em meio alcalino, com molibdato.

Este método permite a detecção de compostos fenólicos e polifenólicos com capacidade antioxidante (Gulçin 2012).

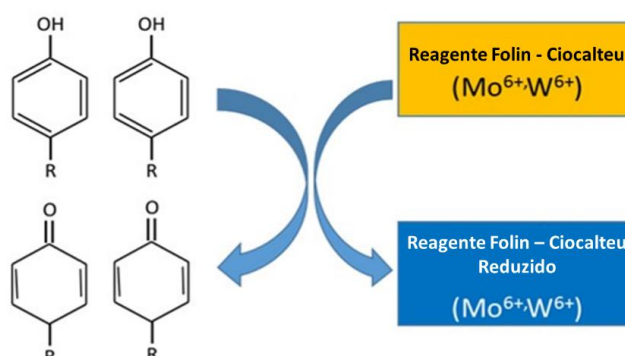


Figura 13 - Reação de *Folin - Ciocalteu* com transferência de elétrons e espécies redutoras de molibdênio para determinação de fenóis totais. Fonte: Adaptado de: (Bioquochem, 2019)

1.4.1.3. Capacidade de captação do radical DPPH

O método DPPH é dos métodos mais antigos utilizados para determinar a atividade antioxidante. Devido a isso, este método é usado em diversas aplicações, sendo desde então utilizado para medir o potencial antioxidante de fenólicos em matrizes alimentares bem como amostras de extratos de plantas.

O radical DPPH é um conjunto de radicais de nitrogênio, de cor púrpura. Na reação, os antioxidantes presentes na amostra reduzem o radical DPPH ao composto corado difenil – picril-hidrazina. O método baseia-se na redução do DPPH em solução alcoólica na presença de um antioxidante doador de um átomo de hidrogênio que é assim capaz de formar um não radical DPPH – H. A medição espectrofotométrica pela qual é feita a determinação mede a capacidade de redução dos antioxidantes na presença do radical DPPH (Alves et al. 2010) (Figura 14).

A reação é influenciada pelo tipo de solvente e pelo pH do meio. As condições ideais devem ser um meio com água/etanol (v/v: 50/50) uma vez que consegue que a reação ocorra para compostos antioxidantes lipofílicos e hidrofílicos. É ainda de acrescentar que a capacidade antioxidante dos polifenóis mais comuns, depende das suas capacidades redox, dos grupos hidroxilo e do potencial dos elétrons se deslocalizarem ao longo da estrutura química, gerando muita formas de ressonância.

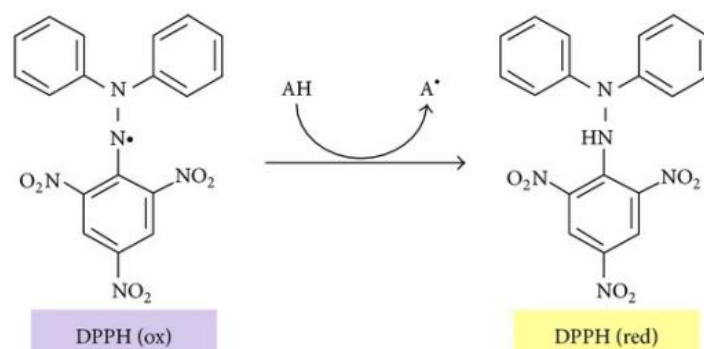


Figura 14 - Redução de DPPH na presença de um antioxidante doador de um átomo de hidrogénio.
Fonte: (Javier López do Campo, 2017)

1.4.2. Textura

Ao conjunto das propriedades físicas, percebidas através do tato, visão e audição dá-se o nome de textura. A textura é determinada pelas interações moleculares dos constituintes e a percepção da mesma é consequência da estrutura interna do material (Sousa 2001).

A textura é dos parâmetros mais importantes na aceitabilidade do produto pelo consumidor, e mediante o produto alimentar em causa têm-se em conta determinados parâmetros. Nos produtos de panificação as propriedades a ter em conta são a firmeza ou dureza para massas e pão e também a adesividade para massas. O termo firmeza ou dureza é aplicado consoante o tipo de material a estudar, no entanto, ambos têm o mesmo significado físico. Se o material é predominantemente sólido, como os frutos, dá-se o nome de dureza; se o material é menos firme, como é o caso da massa e do pão, dá-se o nome de firmeza (Sousa 2001).

O texturómetro, desenvolvido pela *General Foods Technical Center, Tarrytown, N.Y.*, é um instrumento que simula a ação da mastigação na boca humana, através de um ensaio empírico. O equipamento possui um dinamómetro, um medidor de força, que através de uma sonda contacta com a amostra e deforma o alimento, por processo de compressão, penetração ou tração (Friedman *et al.*, 1963).

A Análise do Perfil de Textura, TPA, foi desenvolvida com o objetivo de estudar as propriedades mecânicas dos alimentos e de que forma essas propriedades se relacionam com a textura. No teste são imitadas as condições a que os alimentos são submetidos durante o processo de mastigação, sendo feitas duas penetrações ou compressões, intervaladas entre si, com o objetivo de simular a ação de duas dentadas no alimento (teste das duas dentadas). Neste teste é obtido um texturograma, onde se representa a Força *versus* Tempo ou Força *versus* Distância (Figura 15) (Sousa 2001).

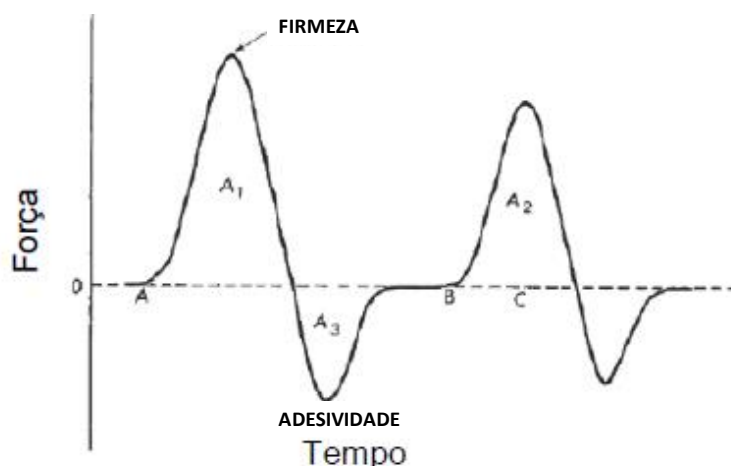


Figura 15 - Texturograma obtido no teste de Análise de Perfil de Textura.
Fonte: Adaptado de: (Friedman *et al.*, 1963)

Através da Análise de Perfil de Textura são calculados vários parâmetros, como elasticidade, dureza, adesividade, coesividade, fraturabilidade, destacando-se para as massas e pão, a firmeza, adesividade e coesividade. Denomina-se como firmeza a força máxima durante a primeira compressão/penetração e corresponde ao pico máximo na primeira compressão; a adesividade corresponde ao trabalho necessário para ultrapassar as forças de atração entre o produto e a superfície da sonda, e corresponde à área negativa entre os dois ciclos (A3); a coesividade corresponde ao quociente entre a área 2 (A2) e a área 1 (A1) e corresponde à resistência a uma segunda deformação em relação à resistência a uma primeira deformação (Friedman *et al.*, 1963).

Estes parâmetros têm sido utilizados para fazer uma comparação de atributos sensoriais e propriedades reológicas de alimentos (Friedman *et al.*, 1963).

1.4.3. Comportamento reológico

A reologia é a ciência que estuda a deformação ou escoamento dos materiais quando submetidos a uma determinada tensão, sendo que para materiais sólidos estamos perante uma deformação e para materiais líquidos perante um escoamento. Estes materiais podem ser sólidos, líquidos, espumas, emulsões, géis e materiais fundidos. Nos materiais sólidos a propriedade reológica de interesse é a elasticidade, nos líquidos a viscosidade, e nos materiais que combinam simultaneamente ambas as características, materiais viscoelásticos, a viscoelasticidade (Sousa 2001).

A reologia tem um papel fundamental na indústria alimentar, uma vez que permite determinar a funcionalidade de determinados ingredientes utilizados no desenvolvimento de novos produtos, testar a qualidade do produto final ou intermediário, testar o tempo de

prateleira, fazer uma correlação das propriedades da textura com a estrutura interna do material e sua composição. As massas de panificação são um alvo de estudo da reologia, apresentando um comportamento viscoelástico (Batista 2013).

Na reologia existem três estados estruturais, que permitem fazer uma caracterização reológica: o estado sólido elástico, o fluido Newtoniano e o material viscoelástico.

No estado sólido elástico, existe uma relação proporcional entre tensão e deformação. Esta é independente do tempo, e permite a recuperação total da deformação do material quando a tensão deixa de ser aplicada. O material sólido elástico é também denominado sólido de Hooke. No fluido perfeito, fluido de Newton é medida a viscosidade. A viscosidade é a resistência ao escoamento, resulta do atrito interno entre as camadas do fluido, e quando esta é constante diz-se que estamos perante um fluido perfeito (Sousa 2001).

Ao contrário do fluido perfeito, os fluidos não newtonianos, também denominados de materiais viscoelásticos, apresentam viscosidades que variam com a velocidade de deformação. Estes materiais são muito comuns na indústria alimentar, como tal, muitos estudos se fazem sobre os seus comportamentos e características reológicas. O principal objetivo é determinar o comportamento viscoelástico. Para fazer essa determinação fazem-se vários testes, sendo os mais comuns os testes estáticos: testes de relaxação da tensão e testes de fluência (*creep*), e os testes dinâmicos ou oscilatórios, testes de varrimento de tensão, frequência, tempo e temperatura (Sousa 2001).

Os testes dinâmicos ou oscilatórios são úteis na caracterização da conformação estrutural e interações intermoleculares em solução. Nestes, é aplicada uma tensão ou deformação que varia sinusoidalmente com o tempo, a uma dada frequência, sendo registada a deformação ou tensão resultante. O comportamento reológico dos produtos viscoelásticos é representado pelo módulo complexo G^* (em Pa): $G^* = G' + i G''$, onde G' é o módulo elástico ou de armazenamento e corresponde à energia de deformação armazenada; G'' é o módulo viscoso ou de dissipação e corresponde à energia de deformação dissipada (Sousa 2001).

Para avaliar a microestrutura e prever a estabilidade do sistema, faz-se um teste de varrimento de frequências, onde se registam as variações de G' e G'' em função da frequência, a uma tensão constante, na forma de um espetro mecânico. Esta tensão, é a máxima tensão a aplicar sem que ocorra destruição da estrutura interna e foi determinada anteriormente, por determinação da zona viscoelástica linear utilizando um teste de varrimento de tensão, a uma frequência constante e tensão variável ao longo do tempo (Sousa 2001).

Para fazer todos estes testes de reologia fundamental, em regime oscilatório, utilizam-se reómetros, que podem ter diferentes tipos de sistema sensor (cilindros, pratos paralelos ou cone e prato) que são usados consoante o material em estudo (Sousa 2001).

1.4.3.1. Micro-doughLAB

Com o objetivo de estudar as propriedades do processamento das farinhas e das massas sem se usar uma grande quantidade de amostra (4g), através de testes rápidos e reprodutíveis, a *Perten Instruments* desenvolveu o micro-doughLAB. Este aparelho, pretende imitar os resultados obtidos por métodos empíricos como o farinógrafo (50g ou 300g) ou o mixógrafo (50g), sendo que os três têm em comum um sistema de análise com através da ação de mistura de um braço mecânico rotativo para determinar a qualidade e características de processamento da farinha.

Como medidas importantes da qualidade da farinha tem-se a quantidade de água absorvida para atingir a consistência ideal de massa, exigência de tempo de mistura e estabilidade da massa. A água é adicionada numa quantidade específica que resulta numa consistência padrão de massa que é refletida num determinado torque. O teste padrão, para massas com glúten, visa atingir um torque máximo de 100 mNm, enquanto que para as massas sem glúten, o valor é muito inferior. As amostras podem, através do Método Padrão de Teste de Farinha, também denominadas curvas de mistura, onde se mistura a farinha com a água a temperatura e velocidade constante, ser avaliadas quanto à absorção ótima de água, tempo de desenvolvimento da massa, estabilidade, amolecimento, índice de tolerância à amassadura. A resistência à mistura é medida como torque, e apresentada em gráfico de torque versus tempo (Figura 16). (Perten Instruments 2017)

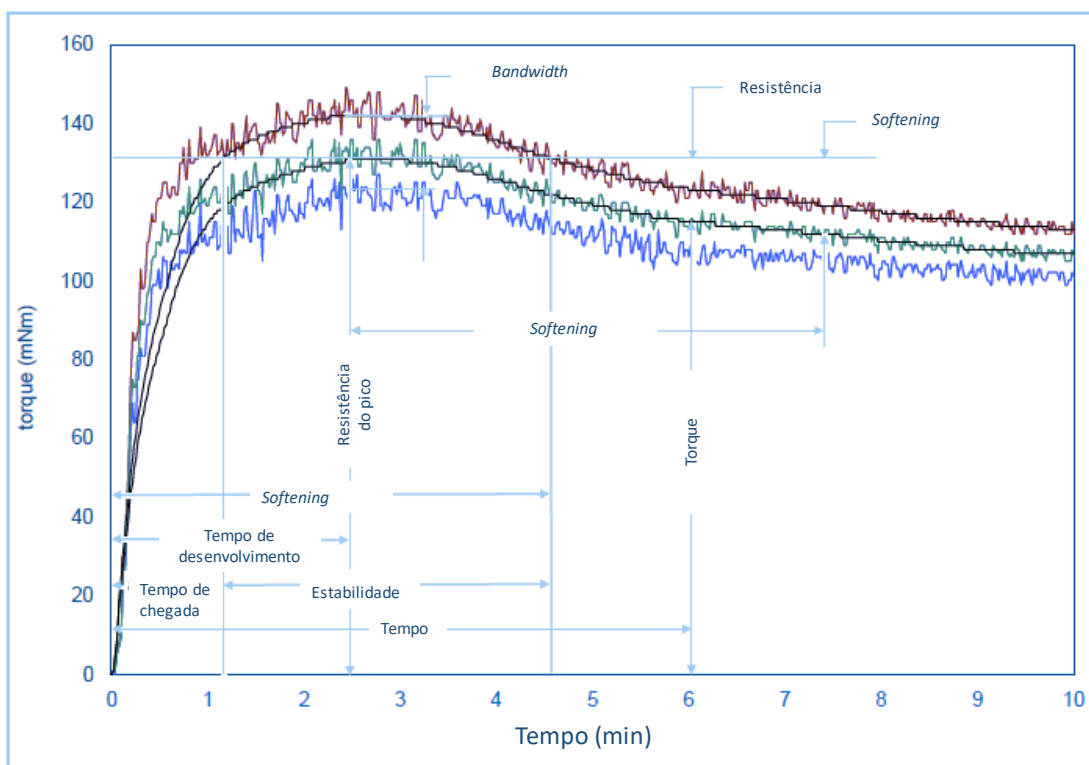


Figura 16 - Curva de mistura obtida pelo micro-doughLAB com identificação dos parâmetros a analisar. Fonte: Adaptado de (Perten Instruments 2017).

1.4.4. Avaliação da cor

A cor é um parâmetro de qualidade avaliado uma vez que pode não só ser fundamental para determinar a aceitação do produto, como permite detetar anomalias ou defeitos que possam aparecer nos mesmos.

Para avaliação da cor em alimentos os métodos mais utilizados são o da colorimetria e da espectrofotometria. A colorimetria é a ciência que estuda e quantifica a forma como o sistema visual humano percebe a cor. Este estudo permitiu a criação de aparelhos, os colorímetros que usam sensores que simulam a forma como o olho humano vê e quantifica as cores e diferença entre estas ou entre estas e padrões. (Becker 2016)

Na medição da cor os sistemas mais utilizados são o sistema $L^*a^*b^*$ e o sistema CIELab, sendo que, ambos compreendem três coordenadas rectangulares:

L^* - mede a variação da luminosidade, sendo que 0 corresponde a preto e 100 a branco, ou simplificando, ao escuro e claro, respetivamente.

a* - é uma coordenada de cromaticidade e varia da cor vermelha (60) à cor verde (-60).

b* - é uma coordenada de cromaticidade e varia da cor amarela (60) à cor azul (-60) (Becker 2016).

A diferença de cor total, também conhecida como ΔE pode ser calculada pela fórmula:

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}}$$

Este parâmetro permite perceber o quanto a diferença é percebida pelo olho humano, sendo que, valores entre 2 e 3.5 permitem a detecção por qualquer indivíduo, mesmo que não tenha colaborado na experiência (Mokrzycki and Tatol 2011).

2. Materiais e Métodos

2.1. Materiais

A microalga *Tetraselmis chuii* foi produzida por um dos parceiros noruegueses do projeto Algae2Future e desidratada por liofilização. A sua composição nutricional parcial (Tabela 1) foi determinada por um dos grupos de investigação desse mesmo projeto na NOFIMA (Noruega). Apesar da utilização da secagem esta amostra será designada por Tc nativa, uma vez que não sofreu mais processamento. Foram ainda usadas outras três amostras desta microalga, com diferentes níveis de disrupção celular de 66%, 77% e 99%. A disrupção celular foi realizada pelos parceiros noruegueses do projeto, usando um moinho de esferas, com as condições operacionais previamente otimizadas por (Fernandes 2019) num trabalho anterior, com posterior liofilização das amostras.

O hidrocolóide hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) Wellence™ Gluten Free 321 foi cedido pela *DOW Industries*. Os outros ingredientes foram adquiridos no mercado nacional: farinha de arroz (marca Espiga), farinha de trigo sarraceno (Próvida), fécula de batata (Globo), levedura desidratada (Fermipan), sal de mesa (Continente), Açúcar (Sidul) e óleo vegetal de girassol (Fula). Os ingredientes utilizados tiveram como critério de seleção o seu custo de mercado e garantia de isenção de glúten.

Tabela 1 - Composição nutricional da *Tetraselmis chuii* liofilizada, produzida pelos parceiros do projeto A2F (NOFIMA).

Composição nutricional	Valores
Proteína	47,7 g/100g
Lípidos	11,4 g/100g
EPA	3,6 % gordura extraída
DHA	0 % de gordura extraída
Sal	2,3 g/100g
Amido	2,4 g/100g
Humidade	7,5 g/100g

2.2 Métodos

2.2.1. Sistemas diluídos

Os sistemas diluídos mencionados na presente tese correspondem a soluções de 10% microalga/água destilada (m/v) homogeneizadas através de dois tipos de agitação: uma agitação rápida, durante um menor período e uma agitação lenta, durante um grande período (horas)

2.2.1.1. Preparação das amostras

De forma a obter sistemas diluídos a partir da microalga com diferentes níveis de disrupção, foram preparadas soluções de 10% microalga/água destilada (m/v), metodologia essa adaptada de Bernaerts *et al.* (2017). As soluções foram agitadas num agitador de eixo rotativo Eurostar 20 digital (IKA LaborTechnik, Germany), a uma velocidade de 1500 rpm, durante 30 min. De seguida, foram colocadas numa câmara frigorífica de temperatura controlada ($4,0^{\circ}\text{C} \pm 0,1$), durante 5 h, a agitar com recurso a um agitador magnético. Esta agitação lenta durante um elevado período de tempo tem por objetivo promover a hidratação.

Para a reologia dos sistemas diluídos foram usadas estas amostras (30 min mais 5 h de agitação). Já para determinação de compostos fenólicos e atividade antioxidante, através dos métodos de DPPH e FRAP, foram retiradas, a cada hora, amostras das suspensões. Este estudo teve como objetivo determinar as condições de máxima extração dos compostos com interesse biológico.

2.2.1.2. Bioatividade

2.2.1.2.1. Determinação de compostos fenólicos totais (F-C)

A determinação dos fenóis totais solúveis foi feita pelo método descrito por (Oktaya, Gulcin, and Kufrevioglu 2003) com algumas alterações. Este teste foi realizado tanto para os sistemas diluídos, antes e após tratamento térmico, como para sistemas concentrados, sendo que para os sistemas diluídos apenas foi necessário retirar uma amostra e diluí-la. Já para as massas fermentadas estas foram partidas em pedaços de menores dimensões, congeladas e liofilizadas (ScanVac CoolSafe 110-4, 15L), tendo sido trituradas num moinho Moligrano (Becken). Para os pães, o miolo foi primeiro triturado no moinho e depois congelado e liofilizado.

Preparou-se um extrato aquoso e a cada 300 μL do mesmo adicionou-se 1500 μL de 0,1 mol/L Folin -Ciocalteu, seguindo-se um tempo de espera de 10 min. Seguidamente adicionou-se 1200 μL de Na_2CO_3 a 7,5% e incubou-se no escuro, durante 2 h à temperatura ambiente. Após o período de espera leu-se a absorvência a 760 nm, utilizando um espectrofotómetro UNICAM UV4 UV/Vis Spectrometer. Para o controlo o mesmo procedimento foi realizado, sendo a única alteração, a substituição do mesmo volume de extrato por água. Os resultados, feitos em triplicado, são expressos em mg eq de ácido gálico/g de matéria seca e são apresentadas as médias e respetivo desvio padrão. Os valores de concentração foram obtidos através de uma curva de calibração onde se usou como padrão o ácido gálico, substituindo-se a amostra por este padrão, a diferentes concentrações.

2.2.1.2.2. Determinação de compostos com atividade antioxidante utilizando o método DPPH

A determinação de compostos com atividade antioxidante foi feita usando o método descrito por Sánchez-Moreno et al., (1999). Este teste foi realizado tanto para sistemas diluídos, antes e após tratamento térmico, como para sistemas concentrados, sendo que para os sistemas diluídos apenas foi necessário retirar uma amostra e diluí-la. O procedimento de congelamento e liofilização das amostras foi realizado da mesma maneira que o realizado para a determinação de compostos fenólicos.

Preparou-se um extrato aquoso e a cada 100 µL adicionou-se 1000 µL de DPPH (90 µmol/L) e 1900 µL de metanol. Incubou-se no escuro, durante 1 hora a temperatura ambiente, e após o período de espera leu-se a absorvência a 515 nm, utilizando um espectrofotômetro UNICAM UV4 UV/Vis Spetrometer. Para o controlo, o volume de extrato foi substituído pelo mesmo volume de metanol e o procedimento foi realizado da mesma forma. Os resultados foram feitos em triplicado sendo apresentadas as médias e respetivo desvio padrão. Estes são expressos em mg eq de ácido ascórbico/g de matéria seca. Os valores de concentração foram obtidos através de uma curva de calibração onde se usou como padrão o ácido ascórbico, substituindo-se a amostra por este padrão, a diferentes concentrações.

2.2.1.2.3. Determinação de compostos com atividade antioxidante utilizando o método FRAP

A determinação de compostos com atividade antioxidante pelo método FRAP foi feito pelo método descrito por (Rufino et al. 2006). Este teste foi realizado tanto para sistemas diluídos, antes e após tratamento térmico, como para sistemas concentrados, sendo que para os sistemas diluídos apenas foi necessário retirar uma amostra e diluí-la. O procedimento de congelamento e liofilização foi realizado da mesma maneira que o realizado para a determinação de compostos com atividade antioxidante pelo método de DPPH.

Preparou-se um extrato aquoso e a cada 90 µL de extrato adicionou-se 270 µL de água e 2,7 mL de FRAP (TPTZ (10mmol/L) em HCl (40mmol/L) mais FeCl₃ (0,02 mol/L) mais tampão acetato (0,3 mol/L pH 3,6) uma proporção de 1:1:10). Incubou-se num banho (Thermo Scientific Precision 2864 Water Bath), a 37°C durante 30 min e leu-se de seguida a absorvência a 595nm, utilizando um espectrofotômetro UNICAM UV4 UV/Vis Spetrometer. Para o controlo o volume de extrato foi substituído pelo mesmo volume de água e o procedimento foi realizado da mesma forma. Os resultados, feitos em triplicado, são expressos em mg eq de ácido ascórbico/g de matéria seca e são apresentadas as médias e respetivo desvio padrão. Os valores de concentração foram obtidos através de uma curva

de calibração onde se usou como padrão o ácido ascórbico, substituindo-se a amostra por este padrão, a diferentes concentrações.

2.2.1.3. Análise do comportamento reológico dos sistemas diluídos

Para a caracterização reológica dos sistemas diluídos adaptou-se o método de Bernaerts et al. (2017). Para esta metodologia utilizou-se um reómetro de tensão controlada (MARS III, Haake, Alemanha) com temperatura controlada por um sistema Peltier, equipado com o sistema sensor de pratos paralelos serrados P60 (60 mm de diâmetro e gap de 0,25 mm).

As amostras foram colocadas no sistema sensor do reómetro, previamente estabilizado a 20°C, e após 5 min de espera para estabilização da temperatura das amostras, realizaram-se os seguintes testes:

Testes dinâmicos - foi realizada a seguinte sequência de testes de forma a simular o tratamento térmico e acompanhar a evolução dos módulos viscoelásticos G' e G'' à frequência constante de 6,28 rad/s (1 Hz):

- a) Varrimento em temperatura de 20° a 90°C: foi realizado um ciclo de aquecimento de 20 até 90°C, de modo contínuo e automático pelo reómetro, a uma taxa de 4,0°C/min;
- b) Varrimento em tempo a 90°C durante 420 s (7 min);
- c) Ciclo de arrefecimento de 90° até 20°C a uma taxa de -4,0°C/min;
- d) Varrimento em tempo a 20°C: o desenvolvimento da estrutura das amostras após o arrefecimento, foi acompanhado através de testes de varrimento em tempo a 20°C durante 3600s (1h);
- e) Varrimento em frequência a 20°C no intervalo de frequência de 0,00628 a 628 Hz.

Todos os testes oscilatórios foram realizados na região de viscoelasticidade linear: 0,1 Pa nos varrimentos de temperatura e tempo e 0,5 Pa nos varrimentos de frequência, tendo sido previamente efetuados testes de varrimento em tensão para determinação da zona viscoelástica linear e seleção da tensão a aplicar em cada teste.

2.2.2. Sistemas concentrados

2.2.2.1. Preparação dos pães com *Tetraselmis chuii*

A formulação escolhida para preparação das massas e pães foi selecionada de estudos anteriores (Fernandes 2019) realizados no âmbito do mesmo projeto A2F (Tabela 2). Tendo em conta os resultados anteriores, selecionou-se a percentagem de incorporação de microalga de 4,0%, uma vez que o pão obtido por Fernandes (2019) apresentava melhores características de qualidade e textura, comparativamente com os outros níveis de incorporação estudados nesse trabalho.

Tabela 2 - Descrição dos ingredientes e respetivas percentagens utilizados na formulação de pão com *Tetraselmis chuii*

Ingredientes	(g)
Farinha de trigo sarraceno	46,0
Farinha de arroz	31,0
Fécula de batata	23,0
HPMC (em relação à mistura de farinhas)	4,6
Óleo (em relação à mistura de farinhas)	5,5
Levedura desidratada (em relação à mistura de farinhas)	2,8
Açúcar (em relação à mistura de farinhas)	2,8
Sal (em relação à mistura de farinhas)	1,8
<i>Tetraselmis chuii</i>	4,0
Água (Base 14% Humidade)	65,0

Para a preparação das massas começou-se por pesar 50g da mistura de farinha de trigo sarraceno, farinha de arroz e fécula de batata, e posteriormente dos restantes ingredientes da receita. Após a pesagem, ativou-se a levedura, adicionando-lhe o açúcar e a água, previamente aquecida a 37°C, utilizando-se uma batedeira (Philips Cucina, 350W), com agitação constante e manual, posição 2, durante 2 min. De seguida foram adicionados os restantes ingredientes durante 10 min, utilizando a mesma batedeira. Após obtenção da massa, esta foi colocada numa forma retangular e colocada numa estufa de fermentação (Unox, Itália) com temperatura controlada de 40°C, durante 50 min. Após a fermentação, a massa foi cozida num forno elétrico (Johnson A60) sem circulação forçada de ar, durante 35 min. Durante o tempo de cozedura da massa, colocou-se um recipiente com água, de forma a evitar a formação precoce da crosta do pão. Após a cozedura dos pães, estes arrefeceram durante 2 h à temperatura ambiente, para posterior corte e análise.

2.2.2.2. Análise das propriedades reológicas das massas durante a mistura

Para analisar as propriedades reológicas das massas e a sua evolução utilizou-se o equipamento Micro-doughLAB 2800 (Perten). As curvas de mistura foram realizadas a uma velocidade de 63 rpm, 30°C, durante 20 min. Para o controlo usou-se uma absorção de água (WA) de 65% para uma base de 14% de humidade das farinhas e microalga. Este valor de absorção de água teve em conta estudos realizados por Fernandes,(2019) e estudos preliminares (resultados não apresentados) de forma a obter um pão controlo com características tecnológicas desejadas. Para as outras amostras, ajustou-se a WA de modo a obter valores de torque máximo idênticos ao do controlo. Só foi necessário ajustar o WA para 66% no caso da Tc 66%D. Os parâmetros avaliados encontram-se representados na secção 1.4.3.1.

2.2.2.4. Análise das propriedades viscoelásticas das massas

Para a caracterização reológica das massas fermentadas utilizou-se um reómetro de tensão controlada (MARS III, Haake, Alemanha) usando o sistema sensor de pratos paralelos serrados (PP20 – 20 mm Ø) com uma distância entre pratos de 1,5 mm, previamente otimizada para análise de massas panares (Graça et al., 2018).

Após a fermentação (numa estufa a 40°C, durante 50 min) de uma porção esférica de massa, esta foi colocada entre os pratos do reómetro (Figura 17), tendo sido posteriormente coberta com parafina líquida para evitar a desidratação durante os testes. Primeiro foi realizado o teste de varrimento de tensão para determinação da zona viscoelástica linear de cada massa e seleccionar a tensão a aplicar no teste de varrimento de frequência. Para o teste de varrimento de frequência, usou-se uma nova porção da massa fermentada, nas msas condições, variando a frequência de 0,01 a 100 Hz. Ambos os testes foram realizados a $5\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ com objetivo de cessar a fermentação, tendo as massas repousado no frigorífico entre testes e sendo a temperatura do teste controlada através de um sistema Peltier acoplado ao reómetro. As determinações foram feitas pelo menos em triplicado para cada massa com incorporação de Tc com vários níveis de disrupção celular.



Figura 17 - Reómetro com sistema sensor de dopratos paralelos serrados com massa de Tc

2.2.2.3. Avaliação da textura das massas e pães

A avaliação da textura foi realizada em sala de ambiente controlado ($T=20^{\circ}\text{C}$), num texturómetro TA.XT.plus (Stable Micro Systems, Reino Unido) equipado com uma célula de carga de 5 kg. Para avaliação dos parâmetros referentes à textura foi feito um teste TPA – Análise de Perfil de Textura, que tem como principal objetivo imitar duas dentadas consecutivas que o alimento sofre na boca. Este teste foi realizado em modo penetrometria, ou seja, utilizando sonda de dimensão inferior à amostra,.

O teste foi realizado para as massas fermentadas e para os pães. Para ambas as medições, foi utilizada uma sonda acrílica com 10 mm de diâmetro (p/10), tendo sido feitas pelo menos 4 repetições para os dois casos, sempre em locais distintos, com uma distância de penetração de 8 mm, velocidade de 1 mm.s⁻¹ e um tempo de espera entre ciclos de 5 s. Para as massas a medição foi realizada no mesmo recipiente retangular que foi colocado na estufa de fermentação, enquanto que para os pães foram cortadas 2 fatias do meio com 2 cm de altura (Figura 18).

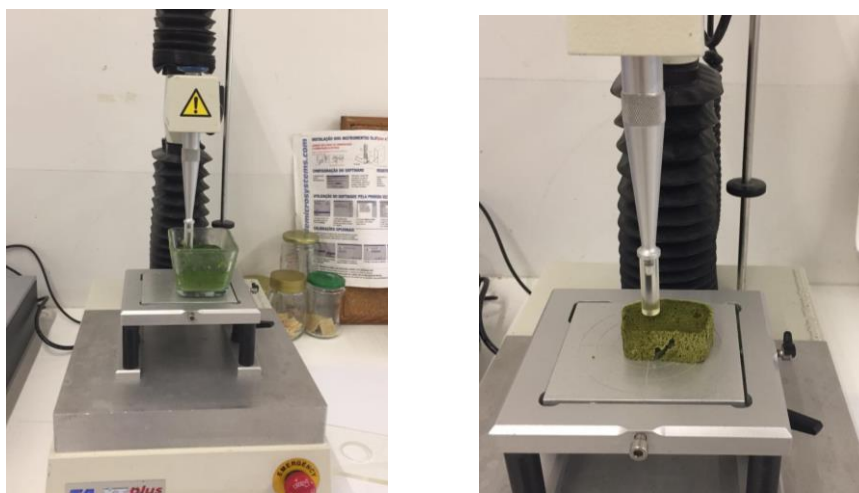


Figura 18 - Teste de perfil de estrutura (TPA) na massa com Tc (à esquerda) e no pão (direita), com uma sonda de 10mm Ø, realizado no texturómetro

Os resultados foram obtidos em forma de texturogramas de força *versus* tempo, a partir dos quais se determinaram a firmeza (N), coesividade (adimensional) e adesividade (N.s).

2.2.2.5. Análise do pH

A determinação do pH foi feita para os sistemas diluídos como para as diferentes massas fermentadas foi realizada no equipamento pH Basic 20, CRISON. A determinação foi feita no primeiro caso por introdução do eléctrodo na suspensão, enquanto que para o segundo caso por perfuração da massa com o eléctrodo e medição direta, tendo sido feita em triplicado para cada massa e apresentadas as médias e respetivo desvio padrão.

A calibração do equipamento foi sempre realizada com o eléctrodo dos corpos sólidos e com as respetivas soluções de pH 4 e pH 7.

Para cada sistema diluído foi medido o pH, sendo que, antes do tratamento térmico este variou entre 8,7 e 8,9 e após processamento térmico entre 7,7 e 8,1, permitindo concluir-se que para todos os sistemas diluídos ocorre uma diminuição do pH após o tratamento térmico.

Para os sistemas concentrados, mais concretamente, massa fermentada a adição de microalga Tc leva a um aumento no valor de pH. A massa fermentada com pH mais ácido é a massa controlo (5,31), sendo a única massa que apresenta pH significativamente diferente ($p < 0,05$). Com incorporação de microalga ocorre um aumento no pH, sendo a massa obtida menos acídica que o controlo e com valores entre os 5,7 e os 5,5, valores já obtidos por (Schwenzfeier, Wierenga, and Gruppen 2011) e (Fernandes 2019). Esta diminuição da acidez

está relacionada com o pH natural da microalga, que sendo diferente do das farinhas utilizadas para o controlo, gera uma massa com pH diferente.

2.2.2.6. Análise instrumental da cor das massas, cor do miolo e da côdea dos pães

A avaliação instrumental da cor da massa, cor do miolo e da côdea do pão foi realizada através do Colorímetro Minolta CR-400, Japão, com o Illuminante D65 tendo sido expressa em valores de L^* , a^* e b^* (coordenadas do sistema CIELAB). Neste sistema, as cores são descritas através de Luminosidade (L^*) e das coordenadas a^* e b^* . Os valores de L^* variam entre 0 (escuro) e 100 (claro), os valores de a^* variam entre +60 (amarelo) e -60 (verde) e b^* entre +60 (amarelo) e -60 (azul).

Para cada formulação foram realizadas pelo menos quatro repetições, as quais se apresentam as médias e respetivo desvio padrão. Antes de cada ensaio, o colorímetro foi calibrado com o padrão branco Minolta ($L=97,21$, $a=+0,14$, $b=+1,99$).

Para saber o impacto da incorporação de Tc na cor das massas calculou-se a diferença total de cor (ΔE) entre amostra controlo e amostra com incorporação de microalga. Esta diferença é resultante da equação:

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}}$$

2.2.2.7. Análise da atividade da água (a_w) dos pães

As medições da atividade da água do miolo do pão foram realizadas através do equipamento HygroPalm AW (Rotronic, Reino Unido) a temperatura constante ($20,0 \pm 1^\circ\text{C}$). Para estas medições foi necessário que, após arrefecimento do pão, se esfarelasse o miolo em dimensões mais reduzidas. As medições foram realizadas em triplicado para cada pão e apresentadas as médias e respetivo desvio padrão.

2.2.2.8. Análise da humidade dos pães

As medições da humidade do miolo do pão foram efetuadas após arrefecimento e esfarelamento do miolo, com o equipamento de análise por infravermelho, ADAM PMB 202. Para cada pão foram efetuados ensaios em triplicado e apresentadas as médias e o respetivo desvio padrão.

2.2.2.9. Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada no programa estatístico *OriginPro8*. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e aplicou-se o teste de Tukey para um nível de significância de 95% ($p < 0,05$). O objetivo é verificar se existem diferenças

significativas ou não, entre os valores médios obtidos. Para fazer as correlações o programa utilizado foi o Stastitica.

3. Resultados e Discussão

3.1. Sistemas diluídos de *Tetraselmis chuii*

3.1.1. Antioxidantes

De forma a determinar os compostos antioxidantes, fenólicos ou não, foram realizados sistemas diluídos de 10% (m/v) de *Tetraselmis chuii*, tendo-se submetido os mesmos a tratamento térmico, de forma a estudar de que forma o tratamento influencia a concentração destes compostos bioativos de interesse. Os sistemas diluídos foram submetidos a agitação mecânica, durante 5h30, a 4°C. Os resultados para os fenóis totais (F -C) e atividade antioxidante, tanto pelo método do DPPH como do FRAP, antes e após o tratamento térmico das suspensões de Tc com diferentes níveis de ruptura celular, encontram-se representados nas Figura 19, Figura 20 e Figura 21.

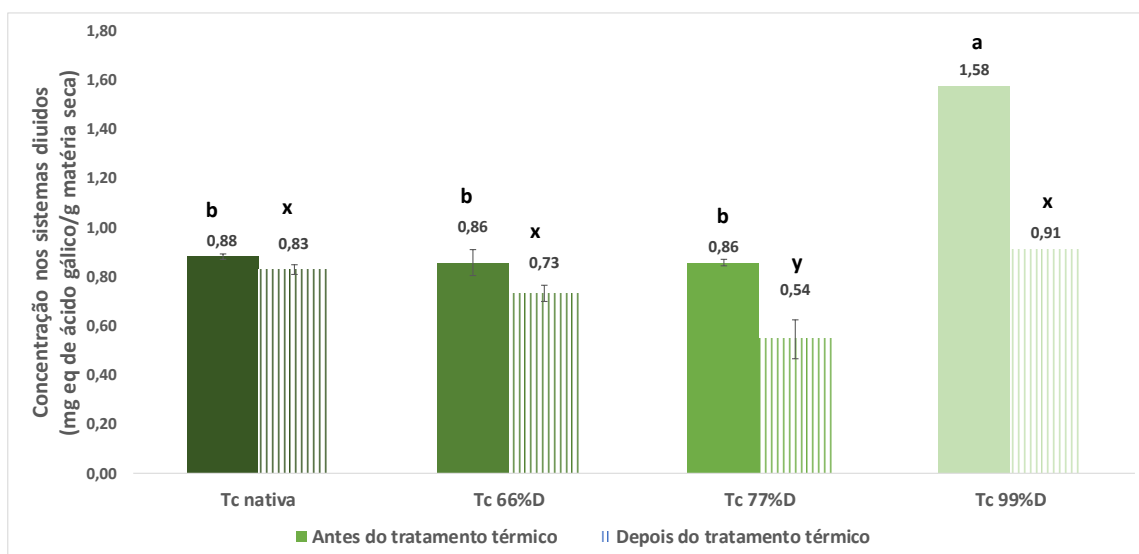


Figura 19 - Concentração de compostos fenólicos totais para os sistemas diluídos de *Tetraselmis chuii* antes e depois do tratamento térmico.

*Letras iguais correspondem a valores não significativamente diferentes entre os níveis de ruptura celular ($p > 0,05$).

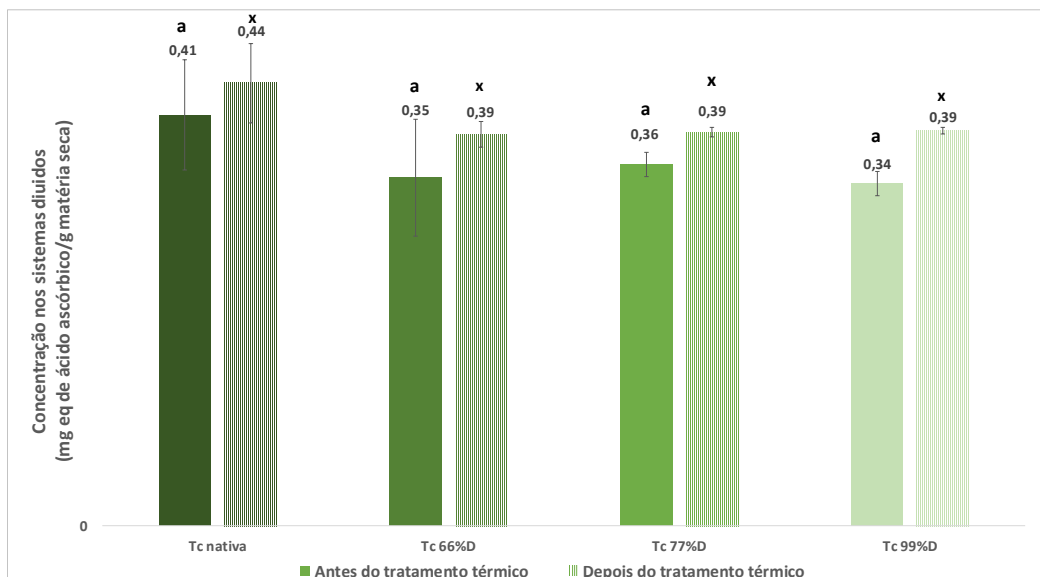


Figura 20 - Concentração de compostos com atividade antioxidante pelo método DPPH para os sistemas diluídos antes e depois do tratamento térmico.

*Letras iguais correspondem a valores não significativamente diferentes entre os níveis de ruptura celular ($p > 0,05$).

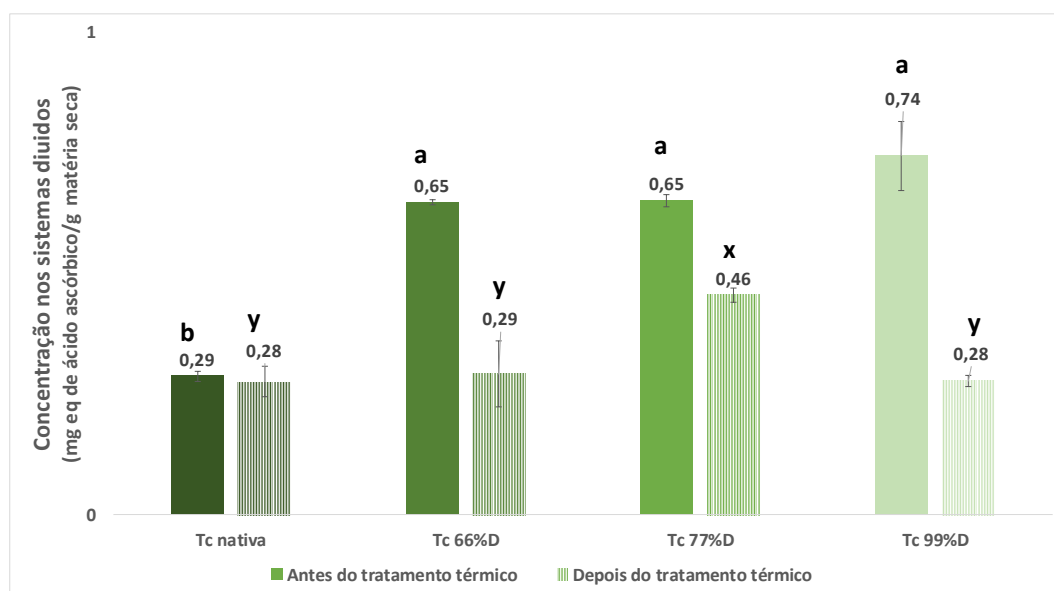


Figura 21 - Concentração de compostos com capacidade antioxidante pelo método FRAP dos sistemas diluídos antes e depois do tratamento térmico.

*Letras iguais correspondem a valores não significativamente diferentes entre os níveis de ruptura ($p < 0,05$).

Através do método de F-C para determinação de fenóis totais (Figura 19) é possível verificar que o tratamento térmico promove uma diminuição na concentração destes compostos. Esta diminuição está em concordância com os resultados obtidos por Zhang and Hamazu (2004) que estudaram o efeito da atividade antioxidante, concentração em fenóis totais e carotenoides em brócolos, após estes terem sido submetidos a dois tipos de tratamento térmico. Estes resultados podem dever-se à agregação em complexos de maiores dimensões, como explicado por Ballester-Sánchez *et al.* (2019), ou então, pela quebra de

estrutura dos compostos fenólicos (Xu et al. 2019). O sistema diluído com *Tetraselmis chuii* sem disrupção é a que apresenta menor diferença entre a concentração de compostos fenólicos antes e depois do tratamento térmico, devido à menor disponibilidade dos compostos uma vez que se encontram encapsulados no interior das células da microalga. Para além do processo de disrupção, o processamento térmico influencia a saída destes compostos das células, tal como sugerido por Choi et al. (2006). Relativamente ao efeito do processo de disrupção no teor de compostos fenólicos, antes do tratamento térmico, o sistema diluído com maior nível de disrupção Tc 99%D é o que apresenta maior teor de fenóis totais, sendo significativamente diferente dos restantes sistemas ($p < 0,05$). Após tratamento térmico, não existem diferenças significativas entre todos os sistemas estudados, à exceção do Tc 77%D que apresenta o menor valor.

Através do método DPPH, Figura 20, é possível verificar que o tratamento térmico promove o aumento da capacidade antioxidante para todos os sistemas diluídos exceto os sistemas diluídos com Tc nativa. Estes resultados estão em concordância com o estudo de Kuszczewicz et al. (2008) que estudaram o efeito do aquecimento e da fermentação nas propriedades antioxidantes do repolho e verificaram que as elevadas temperaturas promovem a libertação e formação de espécies capazes de captar os radicais, espécies essas que podem ser intermediárias das reações de *Maillard*. Tanto antes como após o tratamento térmico, a concentração de compostos antioxidantes não apresenta diferenças significativas para as suspensões com diferentes graus de disrupção ($p > 0,05$). Verifica-se assim que a disrupção celular efetuada não afeta a capacidade antioxidante dos sistemas diluídos e que os compostos detetados através do método DPPH estão na sua maioria disponíveis, não sendo necessário o processo de disrupção para que sejam libertados das células. No entanto, seria expectável que a disrupção promovesse uma maior saída da clorofila dos cloroplastos, uma vez que o moinho de esferas danifica a parede celular, levando à libertação de pigmentos intra-tilacóidais (Safi et al. 2015). A clorofila, composto maioritário disponível em microalgas, sob forma a e b, tem capacidade de captar o radical DPPH e promover mecanismos de transferência eletrónica, resultando em elevados poderes antioxidantes (Batista et al. 2017).

Através do método FRAP, Figura 21, obtiveram-se resultados idênticos aos obtidos para os compostos fenólicos. É possível observar uma diminuição acentuada da concentração de compostos com capacidade antioxidante quando os sistemas diluídos de *T. chuii*, sujeita a disrupção celular, são submetidos a tratamento térmico. O sistema Tc nativa é o que apresenta menor atividade antioxidante antes do tratamento térmico, sendo significativamente

diferente ($p < 0,05$) das amostras com disrupção celular. Após tratamento térmico Tc nativa não apresenta uma capacidade antioxidante significativamente diferente ($p > 0,05$) de Tc 66%D e Tc 99%D. Estes resultados sugerem que embora o processo de disrupção celular promova a saída de compostos naturalmente encapsulados na microalga no estado nativo, o tratamento térmico posterior conduz à degradação de alguns destes compostos, não havendo diferença entre a capacidade antioxidante da Tc nativa e das amostras com disrupção, às excepções da Tc 77%D que apresenta um valor significativamente superior ($p < 0.05$).

Existe correlação entre os métodos F -C e FRAP com um R^2 de 0,78, tal como se pode verificar na Figura 22. Estudos realizados por Liaotrakoon *et al.* (2013) em purés de pitaia e por Rakic *et al.* (2007) em bolota permitiram verificar a existência de correlação entre estes métodos. No entanto, também nesses trabalhos, observaram correlação com o método DPPH, ao contrário do resultado do presente estudo.

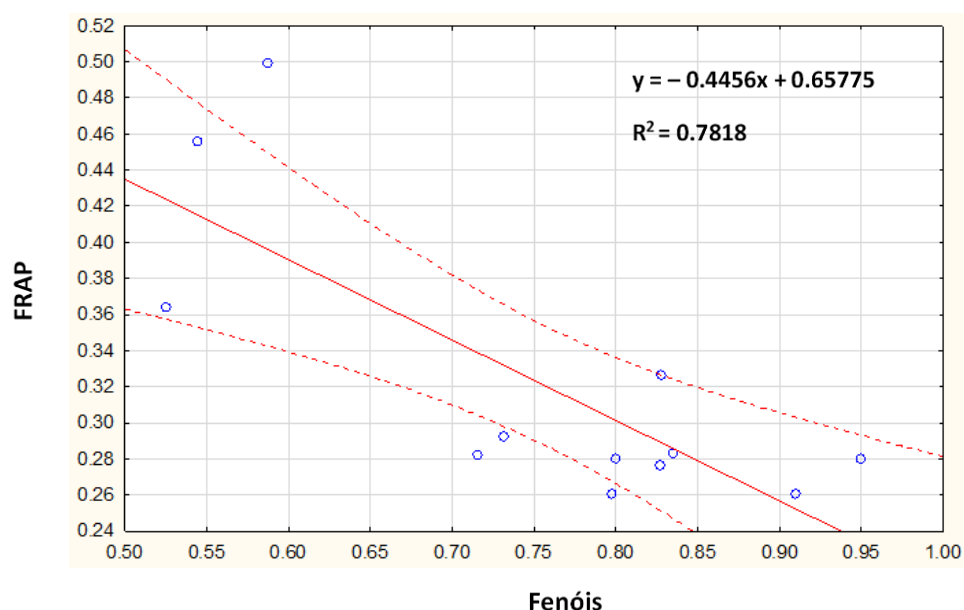


Figura 22 - Correlação entre o método FRAP e de F-C, para determinação de atividade antioxidante e concentração de compostos fenólicos, respetivamente, com um R^2 de 0,78

3.1.1.1. Cinéticas de extração de compostos fenólicos e compostos com atividade antioxidante

Como forma de maximizar a extração de compostos com capacidade antioxidante, fenólicos ou não fenólicos, bem como determinar o tempo ótimo de agitação dos sistemas diluídos, realizaram-se a cada hora determinações pelos métodos de F-C, DPPH e FRAP.

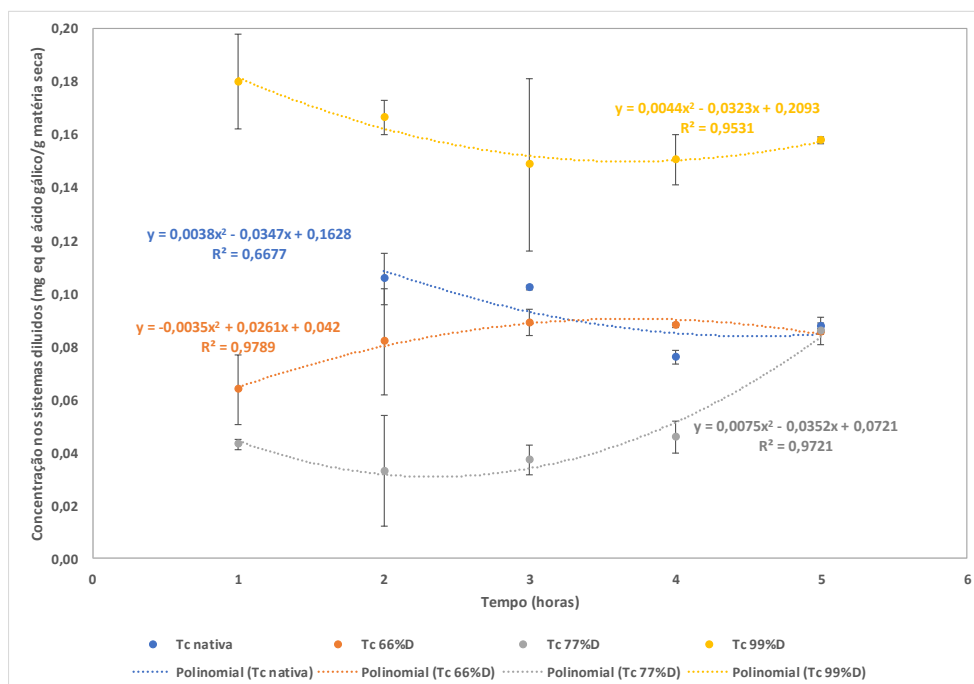


Figura 23 - Cinética de extração de compostos fenólicos totais ao longo de 5 horas de agitação das suspensões de *Tetraselmis chuii* com diferentes níveis de ruptura.

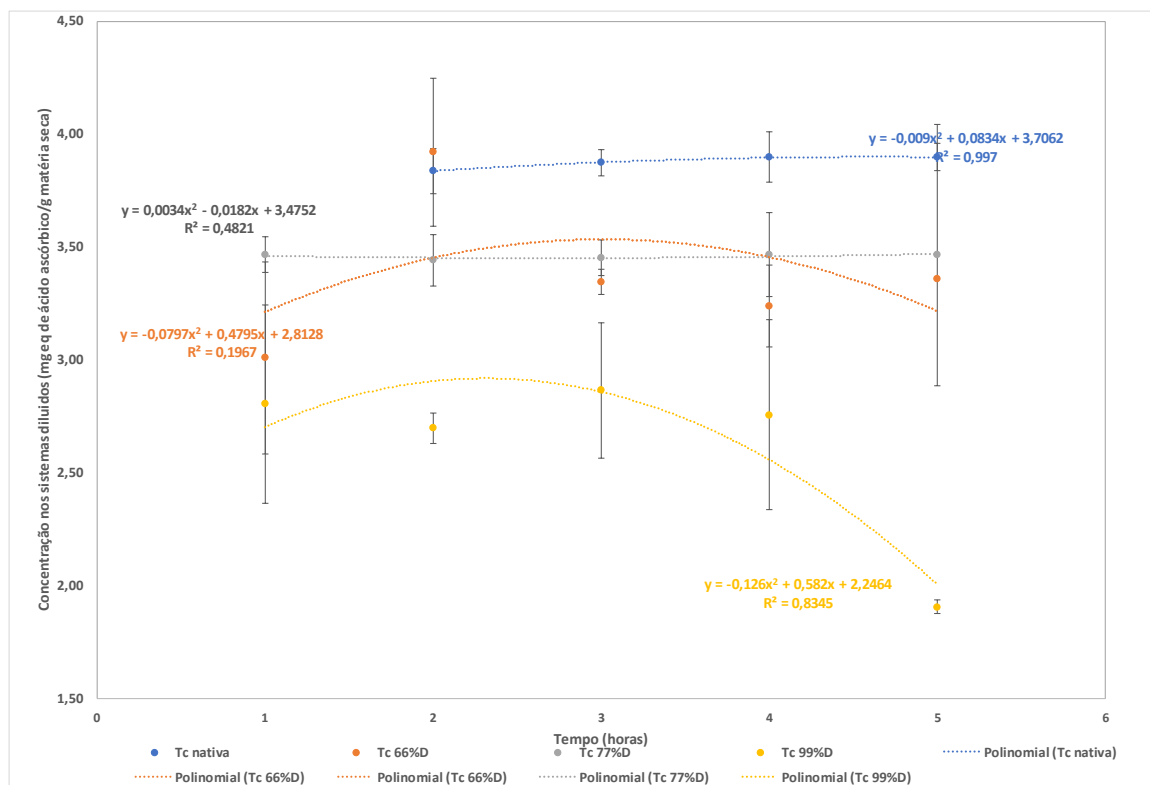


Figura 24 - Cinética de extração de compostos com capacidade antioxidante, quantificados através do método de DPPH, ao longo de 5 horas de agitação das suspensões de *Tetraselmis chuii* com diferentes níveis de disrupção

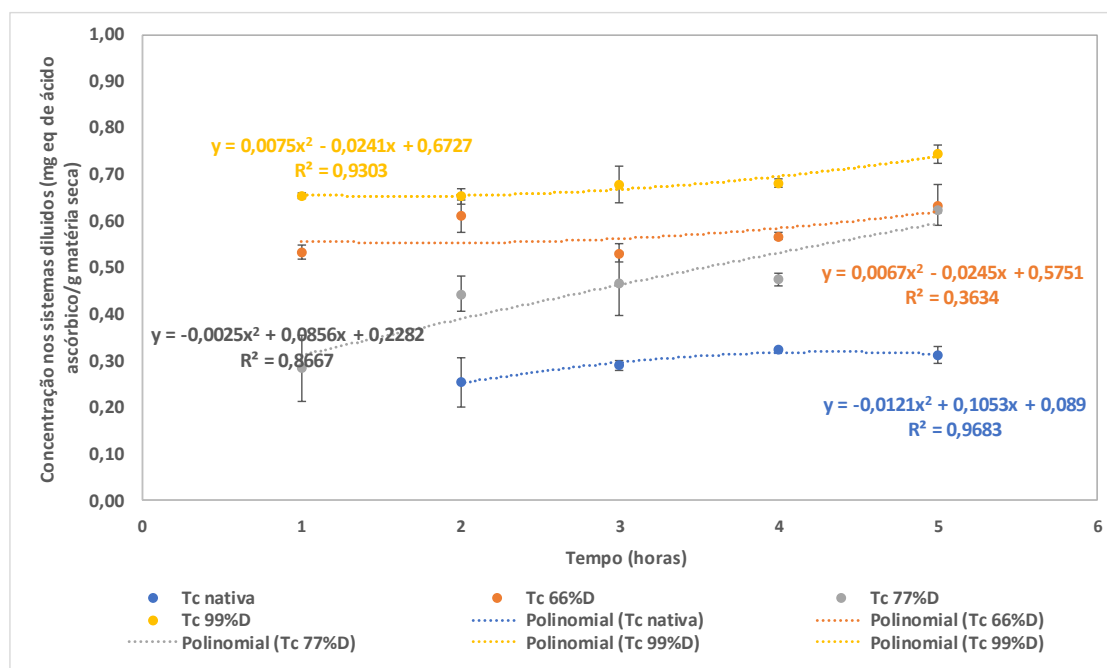


Figura 25 - Cinética de extração de compostos com capacidade antioxidante, quantificados através do método de FRAP, ao longo de 5 horas de agitação das suspensões de *Tetraselmis chuii* com diferentes níveis de disrupção.

Para realização das suspensões usou-se o método de Bernaerts *et al.* (2017), seguido de agitação, de forma a assegurar a hidratação das células. Com o objetivo de avaliar o impacto do tempo de agitação na bioatividade das suspensões, bem como conseguir obter o máximo de rendimento de extração de compostos de interesse biológico, foram retiradas amostras de hora a hora até às 5 horas de hidratação.

É possível concluir que a maior parte dos compostos fenólicos é extraída ao fim de 2 a 3 horas de hidratação, sendo que ao fim das 5 horas há, na maior parte das vezes, uma concentração menor de compostos fenólicos, devido provavelmente à degradação dos mesmos às condições a que estavam a ser submetidos, tal como se pode observar na Figura 23. Os compostos com capacidade antioxidante, determinados pelo método de DPPH, tiveram a sua extração máxima ao fim de 4 a 5 horas (Figura 24 - Cinética de extração de compostos com capacidade antioxidante, quantificados através do método de DPPH, ao longo de 5 horas de agitação das suspensões de *Tetraselmis chuii* com diferentes níveis de disrupção) e os compostos com capacidade antioxidante, captados pelo método de FRAP (Figura 25) tiveram a sua máxima extração ao fim de 2 a 3 horas, na maior parte dos casos, em concordância com os resultados obtidos para os compostos fenólicos.

É ainda possível observar que para a suspensão com 10% de Tc sem disrupção as medições só começaram a ser realizadas ao fim da segunda hora, isto porque, ao fim da primeira hora, as amostras retiradas apresentavam muitas partículas em suspensão, interferindo com os resultados finais. A existência destas partículas indica a instabilidade dos compostos presentes em suspensão, indicando que seria sempre necessário um tempo de hidratação, pelo menos para esta suspensão.

Uma vez que a máxima extração de compostos com capacidade antioxidante, pelo método de DPPH, se deu ao fim das 5 horas, e que em alguns casos o método FRAP continua a extrair compostos de interesse até esse limite temporal, confirmou-se que o tempo de hidratação escolhido era o adequado para os objetivos traçados inicialmente: suspensão com viscosidade adequada e maximização de compostos de interesse biológico.

3.1.2.

3.1.2. Avaliação do comportamento reológico das suspensões

Nas Figura 26 e Figura 27 apresentam-se os resultados obtidos nos testes de varrimento de tempo e temperatura efetuados para os sistemas diluídos 10% (m/v) de Tc sem disrupção (nativa) e com 66, 77 e 99% de disrupção.

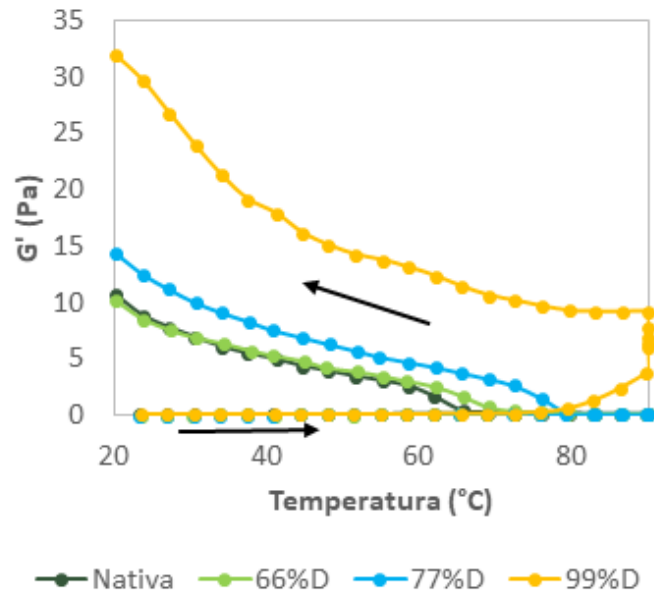


Figura 26 - Evolução do módulo elástico (G') durante o varrimento de temperatura (aquecimento de 20°C a 90°C e arrefecimento de 90°C a 20°C) dos sistemas diluídos de Tc nativa, 66, 77 e 99% de disrupção

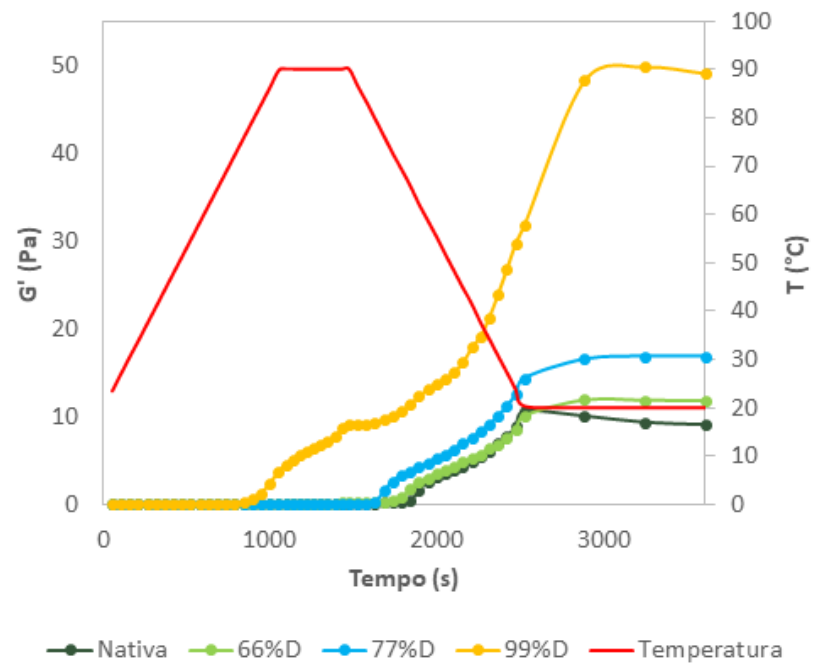


Figura 27 - Evolução do módulo elástico (G') durante os varrimentos de tempo e temperatura dos sistemas diluídos com Tc nativa, 66, 77 e 99% de disrupção

Os valores de G' são muito baixos durante o aquecimento de 20° a 90°C, no caso do sistema diluído de Tc nativa. Para os sistemas diluídos Tc 66% e 77%D só se verifica o aumento do G' na fase de arrefecimento, contrariamente ao que ocorre para o sistema diluído com 99% de disrupção, que apresenta um aumento dos valores de G' durante o aquecimento de 20 a 90°C, mais concretamente por volta dos 80°C. Depois do arrefecimento, a manutenção da suspensão a 20°C durante 60 min não provocou alterações nos valores de G' , que se mantiveram constantes durante este período. Os resultados obtidos mostram que com o aumento da percentagem de disrupção há também um aumento do módulo G' , módulo que traduz o comportamento associado à componente elástica. Este facto leva-nos a assumir que o tratamento térmico promove a saída de compostos intracelulares que irão contribuir para a estruturação dos sistemas (Xu et al. 2019; Ballester-Sánchez et al. 2019).

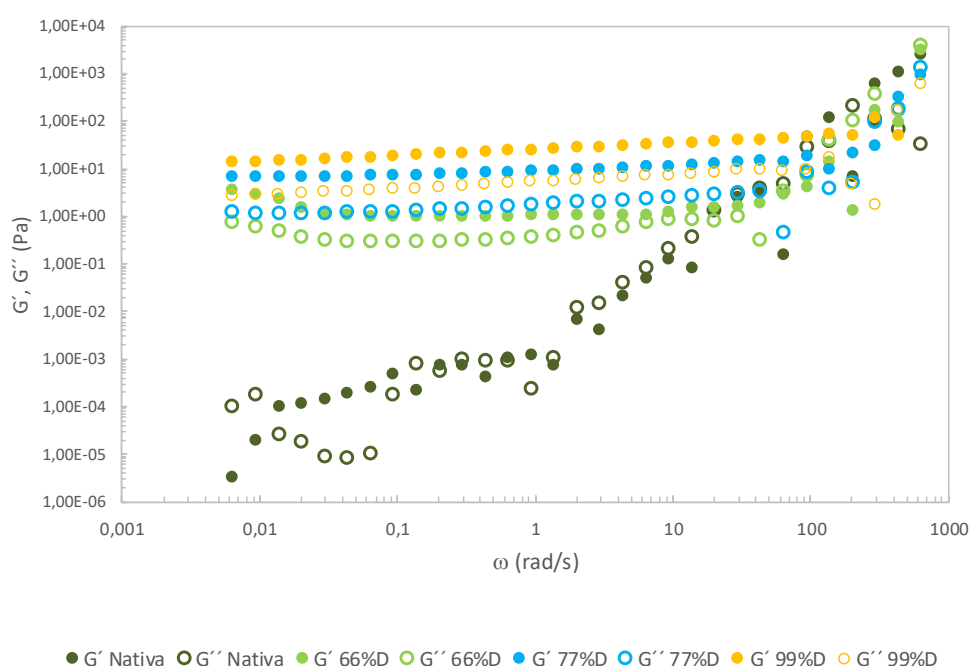


Figura 28 - Espectro mecânico dos sistemas diluídos de Tc nativa com 66, 77 e 99% de disrupção, após tratamento térmico

Na Figura 28 são apresentados os espectro mecânico de todos os sistemas diluídos de Tc em estudo, obtidos após a etapa de aquecimento. É possível verificar que para sistemas diluídos submetidos a disrupção celular os valores de G' e G'' são muito superiores aos valores do sistema diluído de Tc sem disrupção (nativa). O comportamento dos sistemas diluídos com disrupção é a de um gel fraco, com $G' > G''$, sendo estes valores muito próximos e com cruzamento das funções viscoelásticas a altas frequências. Este comportamento já tinha sido observado por (Grossmann et al. 2019) que estudaram a formação de um gel na microalga *Chlorella sorokiniana*. A rede tridimensional formada nos sistemas de Tc com disrupção celular é mais estruturada do que a do sistema Tc sem disrupção. A disrupção

promove a quebra das paredes celulares, ocorrendo saída de compostos celulares, nomeadamente de proteínas e polissacáridos. A interação entre estes compostos e o tratamento térmico posterior resultam na exposição dos grupos reativos, levando a interações proteína-proteína e formação da rede tridimensional (Grossmann et al. 2019). Com os componentes dentro do organito celular, como acontece em sistemas diluídos de Tc nativa, esta rede não se forma. Na amostra nativa ocorre o cruzamento das funções viscoelásticas, correspondente ao comportamento de uma solução de polímero emaranhado, com G'' superior a G' a baixas frequências.

Assim, e através da representação da 29, é possível observar que o aumento do nível de ruptura conduz ao aumento dos valores de G' , sendo que os valores mais elevados são os da suspensão Tc 99%D. Verifica-se assim, que a utilização desta microalga como agente de estrutura em produtos alimentares poderá ser promovida com a aplicação do processo de ruptura celular de forma a conseguir melhor funcionalidade tecnológica da microalga.

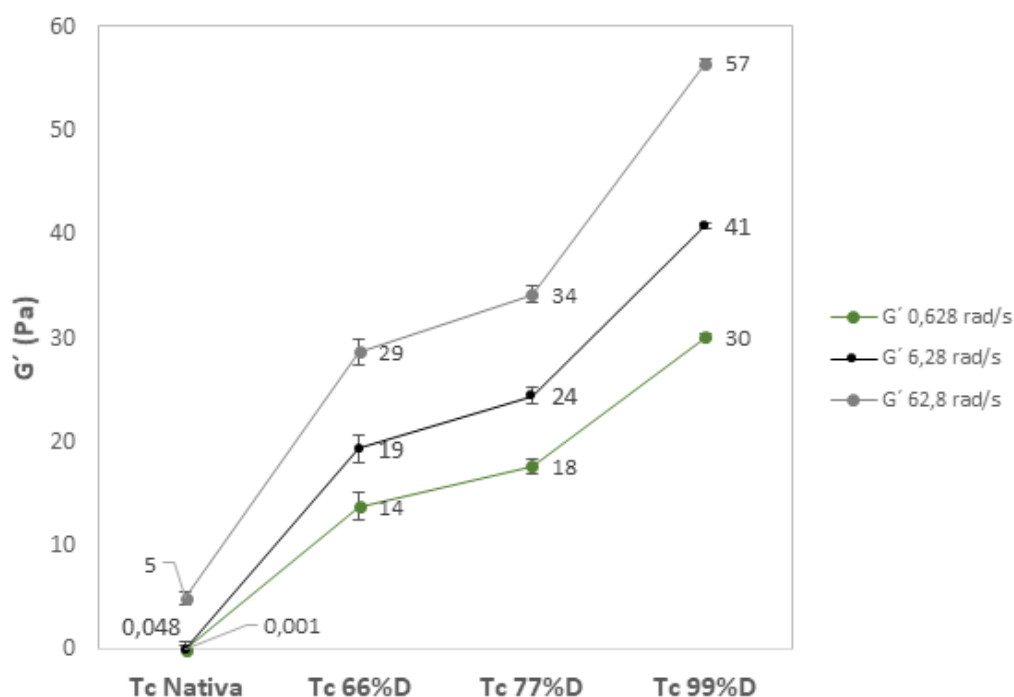


Figura 29 - Valores de G' a 0,628, 6,28, 62,8 rad/s dos sistemas diluídos de Tc sem ruptura (nativa) e com 66, 77 e 99% de ruptura

3.2. Sistemas concentrados com *Tetraselmis chuii*

3.2.1. Propriedades reológicas das massas durante a mistura

Nos ensaios realizados no micro-doughLAB, para todas as misturas de farinhas e microalga usadas nas formulações de pão isento de glúten, obtiveram-se valores de torque

máximo (Pmax) idênticos, com diferenças inferiores a 4%, uma vez que a absorção de água (WA) foi ajustada de modo a obter valores de Pmax próximos da formulação controlo (sem Tc).

As curvas obtidas no micro-doughLAB encontram-se representadas na Figura 30. Na Tabela 3 encontram-se apresentados os parâmetros calculados destas curvas, parâmetros esses nomeados e descritos na secção 1.4.3.1.

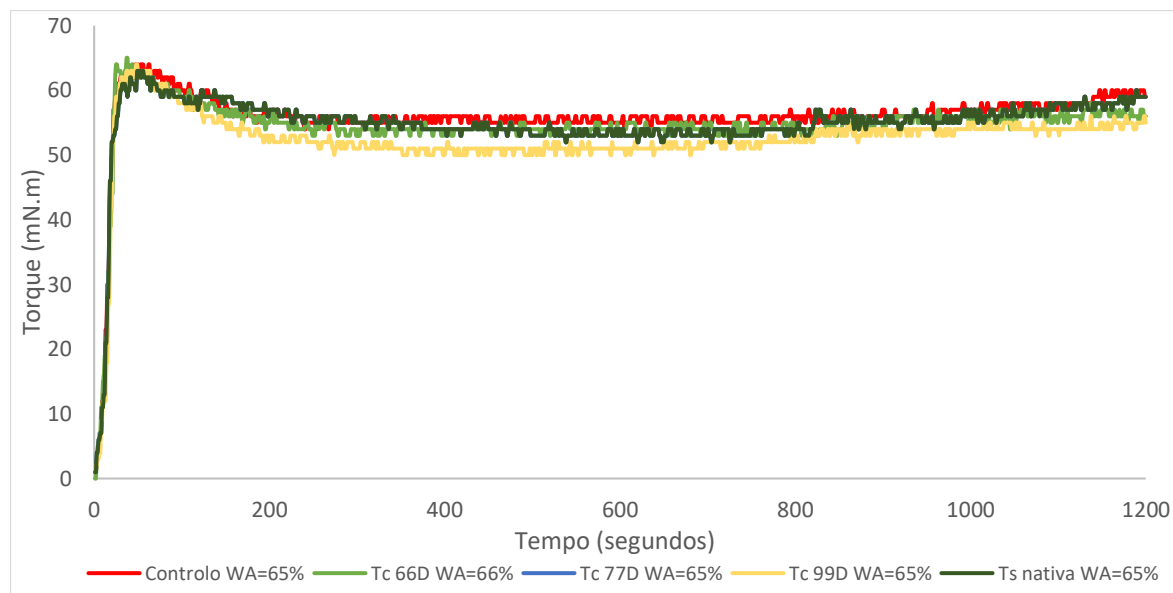


Figura 30 - Curvas obtidas no micro-doughLAB para todas as formulações controlo e com incorporação de *Tetraselmis chuii* com diferentes níveis de disrupção.

Tabela 3 - Resultados obtidos no Microdough-LAB para as diferentes massas: massa controlo e massa com incorporação de microalga com diferentes níveis de disrupção

	Pmax (mN.m)	DDT (s)	Estabilidade (s)	Resistência (mN.m)	Índice de tolerância à mistura (mN.m)	Energia de Pico (Wh/kg)	Diferença de torque no tempo de desenvolvimento (mN.m)	Número de Qualidade
Controlo	60,0±1,5	60,0±3,4	36,0±6,0	6,0±2,1	8,0±1,2	0,70±0,06	3,0±0	67,1±3,5
Tc Nativa	59,5±5,8	57,0±5,7	33,0±7,7	9,0±3	9,5±2,4	0,75±0,10	3,0±0,5	63,3±6,5
Tc 66%D	62,0±3,6	54±0	24,0±3,3	11,0±1,8	12,0±1,5	0,70±0,04	3,0±0,4	57,9±3,6
Tc 77%D	61,5±2,9	57,0±8,5	30,0±4,9	10,5±2,2	9,0±3,4	0,75±0,06	3,0±0,5	59,6±5,9
Tc 99%D	60,0±2,0	54,0±3,4	24,0±7,6	10,0±0,6	11,0±0	0,70±0,06	3,0±0,6	58,1±0,7

Através da análise estatística dos resultados é possível concluir para todos os parâmetros utilizados que não existem diferenças significativas entre massas ($p>0,05$). Estes

resultados são concordantes com Fernandes (2019) que testou a incorporação da microalga *Tetraselmis chuii* em diferentes percentagens nesta formulação de pão isento de glúten. Noutro estudo em massas de trigo com adição de *Chlorella vulgaris* (Graça et al. 2018) verificou-se que a adição de mais de 3% de microalga faz reduzir o teor de absorção de água, e que ocorre uma diminuição do DDT e Estabilidade devido à perturbação da estrutura da massa.

3.2.2. Propriedades de textura das massas

A Análise de Perfil de Textura (TPA), permitiu calcular três parâmetros: firmeza, adesividade e coesividade.

Na Figura 31 encontram-se os resultados da firmeza das massas fermentadas: massa controlo e massas com incorporação de *Tetraselmis chuii* (Tc) com diferentes níveis de disrupção.

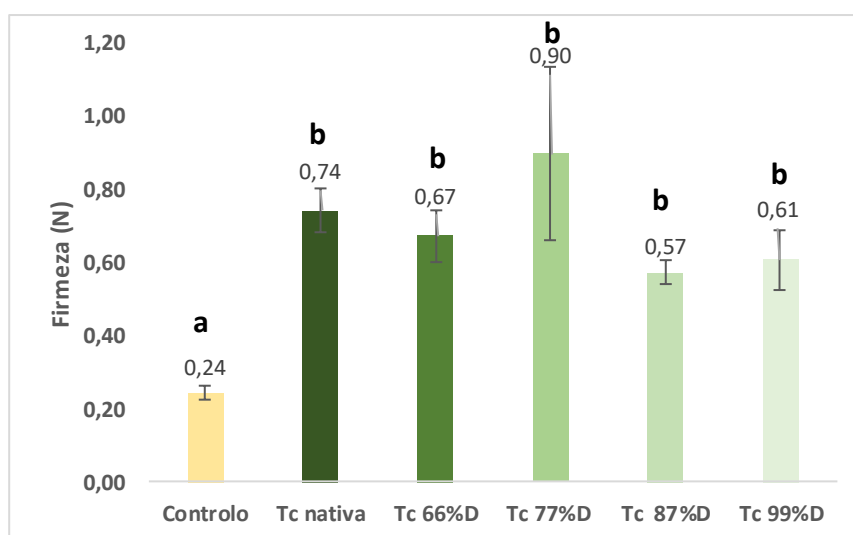


Figura 31 - Valores de firmeza das massas fermentadas: massa controlo e massas com incorporação de *Tetraselmis chuii* com diferentes níveis de disrupção.

*Letras iguais correspondem a valores não significativamente diferentes entre as massas ($p > 0,05$).

A massa controlo é a que apresenta menor firmeza (0,24N), verificando-se um aumento na firmeza com a adição da microalga. Este resultado é idêntico ao obtido noutros trabalhos (Batista et al. 2017; Luísa Gouveia et al. 2007) em que a adição de microalgas reforçou a estrutura interna do produto uma vez que absorvem mais água e gordura, e devido ao seu teor elevado em proteína, que pode reforçar a estrutura da massa. No entanto, não existem diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as massas com Tc com vários níveis de disrupção

celular, ou seja, o processo de disrupção não tem impacto na firmeza das massas fermentadas com incorporação de 4% de Tc.

Na Figura 32 apresentam-se os resultados da coesividade para as massas fermentadas. É possível verificar que não existem diferenças significativas entre massas ($p>0,05$), logo nem a disrupção celular nem a adição de microalga influenciam a coesividade das massas fermentadas que apresenta valores baixos, variando entre 0,20 e 0,27.

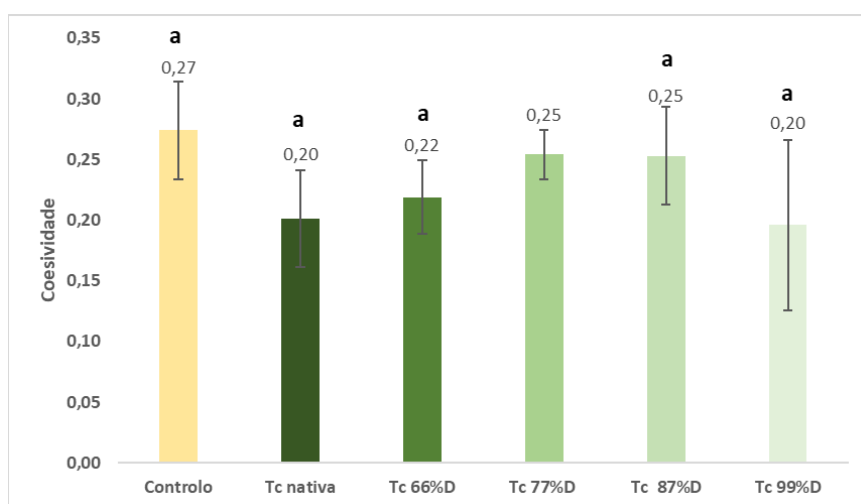


Figura 32 - Valores de coesividade das massas fermentadas: massa controlo e massas com incorporação de *Tetraselmis chuii* com diferentes níveis de disrupção.

**Letras iguais correspondem a valores não significativamente diferentes entre as massas ($p>0,05$)*

Para a adesividade os valores variaram entre 0,01 e 0,15 (-N.s), sendo que para todas as amostras estudadas, também não existiam diferenças significativas ($p>0,05$).

3.2.3. Propriedades viscoelásticas das massas

Na Figura 33 apresentam-se os resultados obtidos nos testes de varrimento de frequência efetuados para as massas fermentadas da formulação controlo e das formulações com incorporação de *Tetraselmis chuii* com diferentes níveis de disrupção.

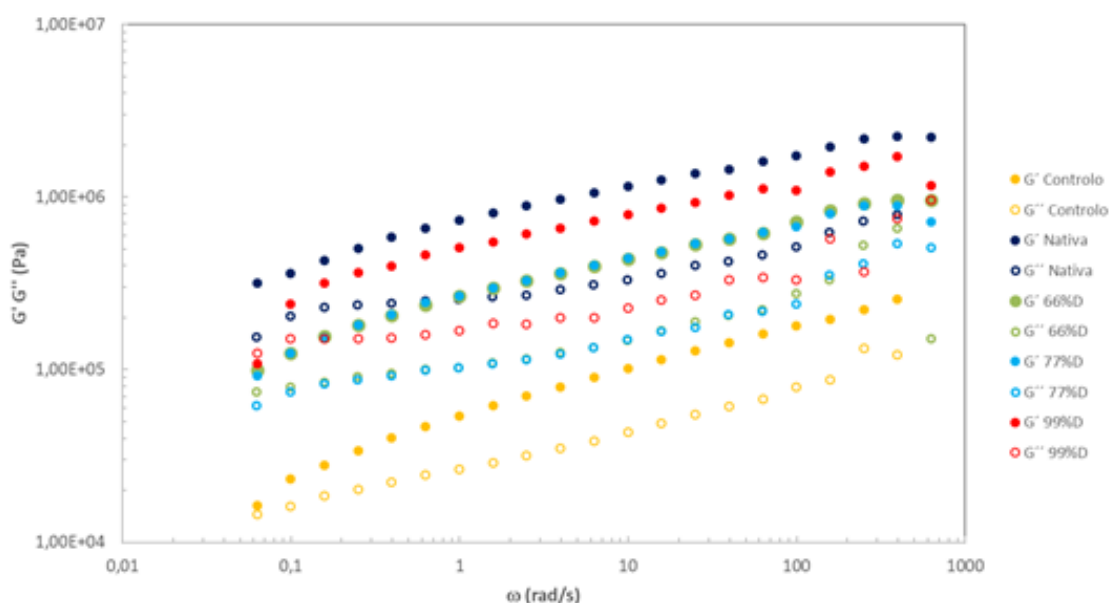


Figura 33 - Espetros mecânicos a 5°C das massas fermentadas controlo e com incorporação de *Tetraselmis chuii* com diferentes níveis de disrupção.

Através dos resultados obtidos é possível verificar que todas as massas possuem uma componente elástica (G') superior à componente viscosa (G'') e ambos são dependentes da frequência, traduzindo um comportamento predominantemente elástico. Este comportamento foi verificado por Mancebo *et al.* (2015) durante o seu estudo de massas de pão sem glúten com adição do hidrocolóide HPMC, verificando que o mesmo aumenta o módulo elástico.

Com a adição de Tc é observado um aumento de cerca de uma década nos valores dos módulos viscoelásticos, reforçando assim a ideia de que a adição de 4% de microalga aumenta o nível de estruturação das massas, devido a um reforço da matriz proteica. Estes resultados estão em concordância com os resultados da firmeza das massas. Contudo, enquanto que nos resultados de textura não se observaram diferenças macroscópicas entre massas com incorporação de Tc com diferentes níveis de disrupção celular, os testes reológicos oscilatórios já permitiram detetar diferenças na estrutura interna das massas. A massa mais estruturada é a massa fermentada com Tc nativa, com maiores valores de G' e G'' , seguindo-se da massa com incorporação de Tc com 99% de disrupção, como é possível verificar na Figura 34. As massas com incorporação de Tc 66%D e 77%D não apresentam valores significativamente diferentes entre si, para os três valores de frequência avaliados. O aumento do nível de estruturação da massa com o aumento do grau de disrupção é explicado pela maior libertação do interior das células das moléculas que vão contribuir para a estrutura das massas GF, principalmente proteínas, e tal é suportado pelos resultados obtidos nos testes reológicos realizados nos sistemas diluídos (secção 3.1.2). No caso da Tc nativa

verificou-se que deu origem ao sistema diluído menos estruturado, pelo facto da proteína se encontrar naturalmente encapsulada nas células. O maior grau de estruturação da massa com Tc nativa poderá ser atribuído ao fenómeno de separação de fases das partículas de microalga das de amido e HPMC, responsáveis pela estrutura da massa, com um efeito sinérgico na estrutura da massa.

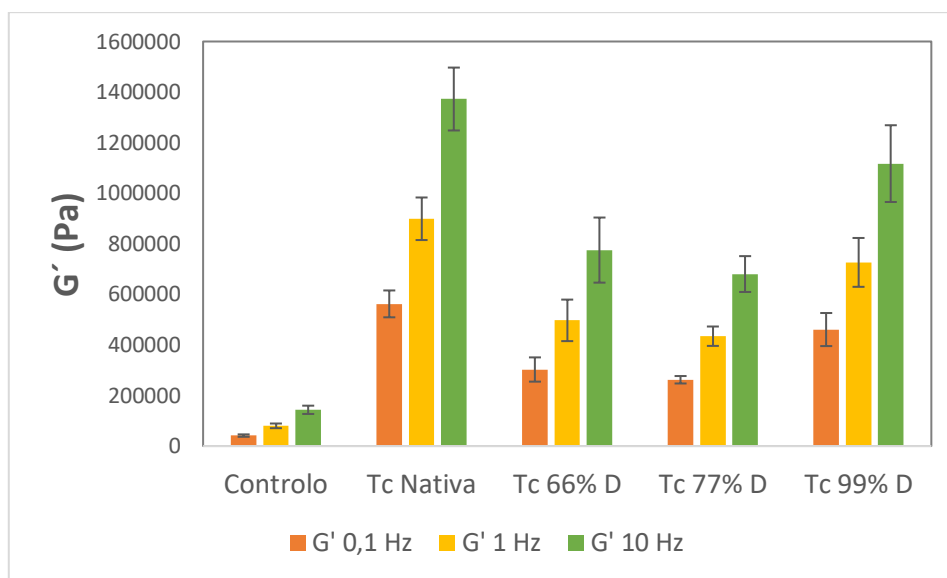


Figura 34 - Valores de G' retirados dos espectros mecânicos a 0,628 rad/s , 6,28 rad/s e 62,8 rad/s Hz das massas fermentadas controlo e com incorporação de Tc com diferentes níveis de disrupção. As massas com incorporação de Tc com 66% e 77% são não significativamente diferentes.

3.2.4. Cor das massas

Na Tabela 4 estão resumidos os valores dos parâmetros da cor, L^* e coordenadas cromáticas a^* e b^* , obtidos para massas fermentadas: massa controlo e massas com incorporação de *Tetraselmis chuii* com diferentes níveis de disrupção.

Tabela 4 - Valores do parâmetro L* e das coordenadas cromáticas a* e b* das massas fermentadas.
*Letras iguais correspondem a valores não significativamente diferentes entre as massas (p>0,05).

	L*	a*	b*	ΔE (comparação com controle)	ΔE (comparação com amostra da linha anterior)
Controlo	71,32 a	2,07 a	17,29 c		
Tc nativa	35,91 b,c	-12,92 b	22,94 a,b	38,82	
Tc 66%D	33,74 c	-14,47 c	22,80 a,b	41,38	2,56
Tc 77%D	32,74 d	-13,86 b,c	21,43 b	41,90	0,52
Tc 99%D	36,77 b	-15,76 d	23,70 a	39,35	2,55



Figura 35 - Massas fermentadas: à esquerda massa fermentada sem incorporação de microalga; à direita massa fermentada com incorporação de 4% de *Tetraselmis chuii*

A massa com coloração mais clara, ou seja L* mais elevado (71,32), é a massa controlo, significativamente diferente das restantes massas (p<0,05). As massas com incorporação de microalga apresentam-se numa localização no espaço de cor nas regiões do verde e do amarelo, ou seja, valores de a* negativos e b* positivos, tal como era esperado, bem como uma menor luminosidade que o controlo (Figura 35).

Através da análise estatística é possível concluir que para os parâmetros L* e a* as massas significativamente diferentes (p<0,05) são a massa controlo e massa com incorporação de Tc com 99% de disrupção. Já no que diz respeito ao parâmetro b* a massa controlo é a única significativamente diferente (p<0,05) das restantes.

Através da diferença total de cor entre as massas com incorporação de microalga, é possível observar que apenas existem diferenças para a massa com incorporação de Tc com 99% de disrupção. As massas apresentam todas o mesmo verde, tal como era esperado, uma vez que a percentagem de microalga incorporada foi sempre a mesma, 4%. A diferença total de cor entre massas permitiu concluir que, duas apresentam valor entre 2 e 3.5, sendo essa

diferença detetada por qualquer individuo, mesmo que não tenha colaborado na experiência (Mokrzycki and Tatol 2011).

3.2.5. Propriedades de textura dos pães

O estudo da textura do pão com recurso ao teste TPA permitiu calcular dois parâmetros, que se consideraram mais representativos para este tipo de material: firmeza e coesividade.

Na Figura 36 são apresentados os resultados da firmeza do pão: pão controlo e pães com incorporação de *Tetraselmis chuii* (Tc) com diferentes níveis de disrupção.

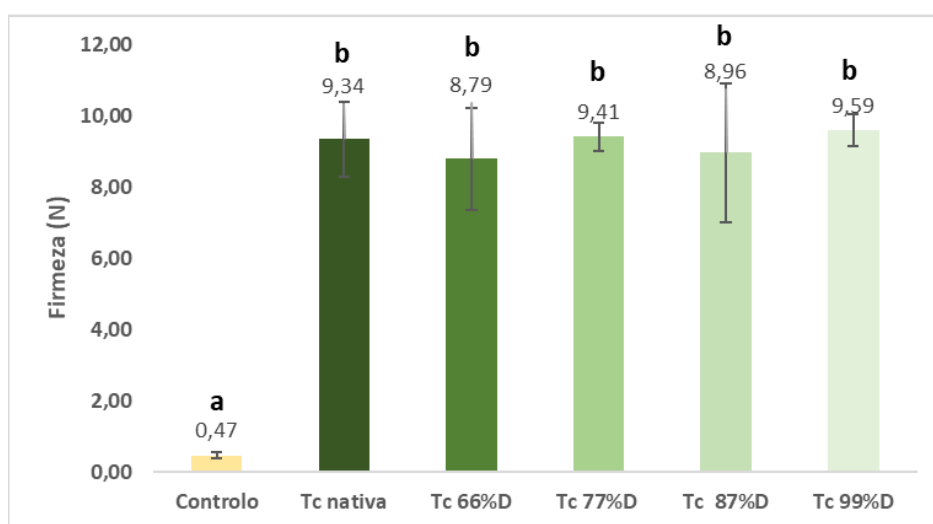


Figura 36 - Valores de firmeza do pão: pão controlo e pão com incorporação de Tc com diferentes níveis de disrupção. *Letras iguais correspondem a valores não significativamente diferentes entre as massas ($p>0,05$)

O pão controlo, sem incorporação de microalga, é o que apresenta menor firmeza (0,47 N). Com adição de microalga ocorre um aumento muito significativo ($p<0,05$) na firmeza dos pães, em concordância com o verificado anteriormente para as massas fermentadas, ou seja, a adição de biomassa microalgal reforça a macroestrutura do produto (Batista et al. 2017; Luísa Gouveia et al. 2007). O mesmo aconteceu em estudos realizados por Fernandes (2019) quando se testou a incorporação de *Tetraselmis chuii* em pães isentos de glúten. Este resultado é explicado pela libertação de constituintes celulares durante o processo de disrupção e durante o tratamento térmico a que o pão foi sujeito (cozedura), já que esses compostos podem interagir e influenciar a textura do pão.

Relativamente ao impacto do grau de disrupção celular, conclui-se que a disrupção não teve impacto na firmeza dos pães, sendo os valores de firmeza não estatisticamente diferentes ($p>0,05$) para os cinco níveis de disrupção estudados.

Na Figura 37 apresentam-se os resultados da coesividade dos pães. O pão controle é o que apresenta maior valor de coesividade (0,65), e a incorporação de microalga conduz a uma diminuição da coesividade, estatisticamente significativa ($p < 0,05$), tal como demonstrado por Fernandes (2019).

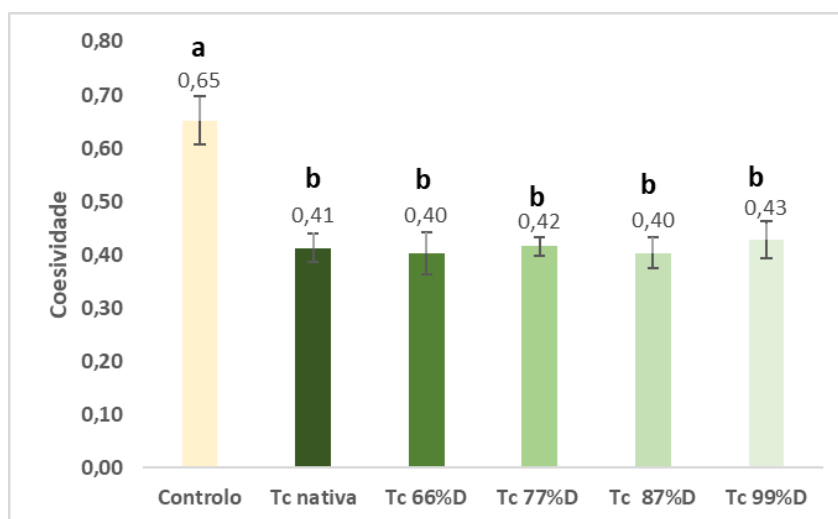


Figura 37 - Valores de coesividade do pão: pão controle e pão com incorporação de Tc com diferentes níveis de disrupção.
*Letras iguais correspondem a valores não significativamente diferentes entre as massas ($p > 0,05$).

No que diz respeito à disrupção, é possível verificar que este processo não tem impacto na coesividade dos pães, registrando-se valores não significativamente diferentes ($p < 0,05$) entre os pães com incorporação de microalga submetida a disrupção.

A cozedura dos pães levou assim a que se registassem diferenças significativas entre o valor de coesividade do pão controle e dos pães com biomassa microalgal, ao contrário do que ocorreu para as massas fermentadas, sendo os valores de coesividade do pão maiores do que os obtidos para as massas, uma vez que o pão é um material mais resistente à segunda deformação por ser mais estruturado do que a massa, que é um material mais esponjoso e facilmente deformável.

3.2.6. Cor do miolo e da côdea dos pães

Na Tabela 5 estão resumidos os valores dos parâmetros da cor, L^* e coordenadas cromáticas a^* e b^* , obtidos para o miolo dos pães: pão controle e pão com incorporação de *Tetraselmis chuii* com diferentes níveis de disrupção. Calculou-se ainda a diferença total de cor (ΔE) entre amostra controle e amostra com incorporação de microalga.

Tabela 5 - Valores do parâmetro L^* e das coordenadas cromáticas a^* e b^* para o miolo dos pães

*Letras iguais correspondem a valores não significativamente diferentes entre as massas ($p>0,05$).

	L^*	a^*	b^*	ΔE (comparação com controle)	ΔE (comparação com amostra da linha anterior)
Controlo	64,71 a	2,07 a	10,49 b		
Tc nativa	30,05 c	-1,46 b	24,98 a	37,73	
Tc 66%D	26,87 d	-1,40 b	11,3 b	38,01	0,27
Tc 77%D	25,72 d	-1,61 b	11,1 b	39,17	1,16
Tc 99%D	32,27 b	-2,98 c	23,94 a	35,48	3,69



Figura 38 - Miolo de cada um dos pães analisados: pão controlo, pão com incorporação de Tc sem disrupção, pão com 66% de disrupção, pão com 77% de disrupção e pão com 99% de disrupção (da esquerda para a direita)

A massa com coloração mais clara, ou seja L^* mais elevado (64,71), é a massa controlo. As massas com incorporação de microalga apresentam-se numa localização no espaço de cor nas regiões do verde e do amarelo, ou seja, valores de a^* negativos e b^* positivos, tal como era esperado, bem como uma menor luminosidade que o controlo (Figura 38).

Em relação à luminosidade (L^*) apenas os pães Tc 66%D e 77%D não são significativamente diferentes ($p>0,05$). A diferença de cor entre o pão Tc nativa e Tc 99%D, mostra que a disrupção tem impacto na cor, apresentando este pão uma luminosidade superior aos dos pães com Tc com níveis intermédios de disrupção celular. Assim é possível concluir que a disrupção influencia as características de cor do miolo dos pães, para níveis de disrupção elevados (99%). Esta influência é possível de ser detetada pelo olho humano visto que os valores de ΔE (nativa vs Tc 99%D) são superiores a 3.5 (Mokrzycki and Tatol 2011).

Na Tabela 6 encontram-se os resultados obtidos para a cõdea dos pães. O pão com cõdea com coloração mais clara, ou seja L^* mais elevado (41,39), é o pão com incorporação de microalga não submetida a disrupção (nativa). A cor das cõdeas com incorporação de microalga apresentam-se numa localização no espaço de cor nas regiões do verde e do amarelo, ou seja, valores de a^* negativos e b^* positivos, tal como era esperado.

Tabela 6 - Valores do parâmetro L* e das coordenadas cromáticas a* e b* para a cõdea dos pães.

*Letras iguais correspondem a valores não significativamente diferentes entre as massas ($p>0,05$).

	L*	a*	b*	ΔE (comparação com controlo)	ΔE (comparação com amostra da linha anterior)
Controlo	38,89 a,b	11,95 a	16,74 b		
Tc nativa	41,39 a	-66,9 e	27,06 a	79,56	
Tc 66%D	37,87 a,b	-5,02 c	15,5 b	17,05	62,52
Tc 77%D	34,96 b	-4,01 b	14,46 b	16,59	0,45
Tc 99%D	40,40 a	-6,86 d	25,38 a	20,75	4,16

Os valores de ΔE apresentam valor superior quando se compara a cõdea do pão controlo com as cõdeas dos pães com incorporação da microalga. Entre os diferentes pães com incorporação de Tc a influência é deteada pelo olho humano duas vezes, visto que os valores de ΔE são superiores a 3.5.

3.2.7. Atividade da água, humidade e perdas na cozedura dos pães

Na Tabela 7 encontram-se representados os resultados obtidos para a atividade da água (a_w), humidade e perdas na cozedura dos diferentes pães.

Tabela 7 - Valores de atividade da água (a_w), humidade e percentagem de perdas na cozedura para os diferentes pães.

* Letras iguais correspondem a valores não significativamente diferentes entre as massas ($p>0,05$).

	a_w	Humidade (%)	Perdas na cozedura (%)
Controlo	0,93±0,01 b	38,43±0,92 a	14,9
Tc nativa	0,96±0,01 a	35,78±1,52 a,b	13,3
Tc 66%D	0,92±0,01 b	36,03±4,44 b	13,0
Tc 77%D	0,95±0,02 a	38,78±0,97 a	12,0
Tc 99%D	0,95±0,02 a,b	38,43±0,95 a	11,6

Através da análise de resultados é possível concluir que a atividade da água para todos os pães é bastante elevada, uma vez que se encontra próxima de 1. Os pães com incorporação de Tc apresentam uma atividade da água superior ao controlo, no entanto, os valores são não significativamente diferentes para todos os pães ($p>0,05$). Assim conclui-se que a adição de *Tetraselmis chuii* não tem impacto na atividade da água. O mesmo foi demonstrado por (García-Segovia et al. 2017) que em GFB com adição de *Tetraselmis*

suecica obtiveram valores de a_w de 0,98. Valores muito elevados de a_w em pão, ou seja, superiores a 0,9, indicam uma baixa estabilidade em termos microbiológicos.(Castro 2003)

Verifica-se que a adição de microalga não aumenta o teor de humidade dos pães, sendo que, os valores de humidade são concordantes com os estudos realizados por (García-Segovia et al. 2017) que utilizaram *Tetraselmis suecica*, uma espécie semelhante à utilizada para estes ensaios. Os resultados mostram que, para todos os pães a humidade é semelhante, variando os valores entre 30 e 40%.

O pão com maiores perdas durante a cozedura foi o pão controlo (15,0%) e o pão com menor perda foi o pão com incorporação de microalga com 99% de disrupção (11,6). É ainda possível verificar uma diminuição das perdas à medida que o nível de disrupção é mais elevado.

3.2.8. Bioatividade das massas e pães

Para determinação da atividade antioxidante foram realizados três métodos: método Folin – Ciocalteu (F-C) para determinação de fenóis totais, DPPH e FRAP. Nas Figura 40, Figura 41 e Figura 42 encontram-se representados os resultados para as diferentes massas estudadas: controlo e com incorporação de microalga com diferentes níveis de disrupção.

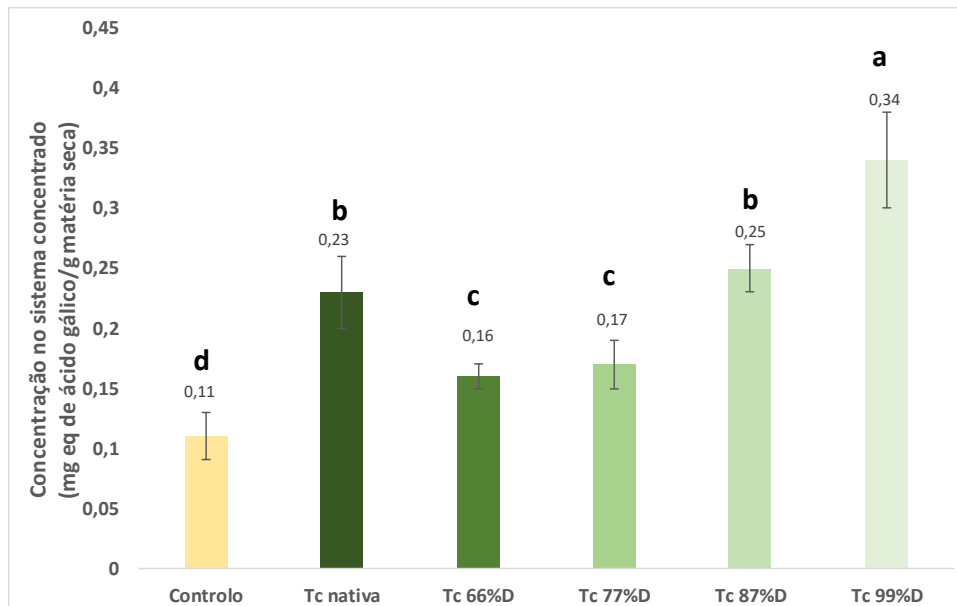


Figura 40 - Resultados obtidos para a massa controlo e massas com incorporação de microalga com diferentes níveis de disrupção, pelo método de F-C – determinação de fenóis totais.

*Letras iguais correspondem a valores não significativamente diferentes entre as massas ($p>0,05$).

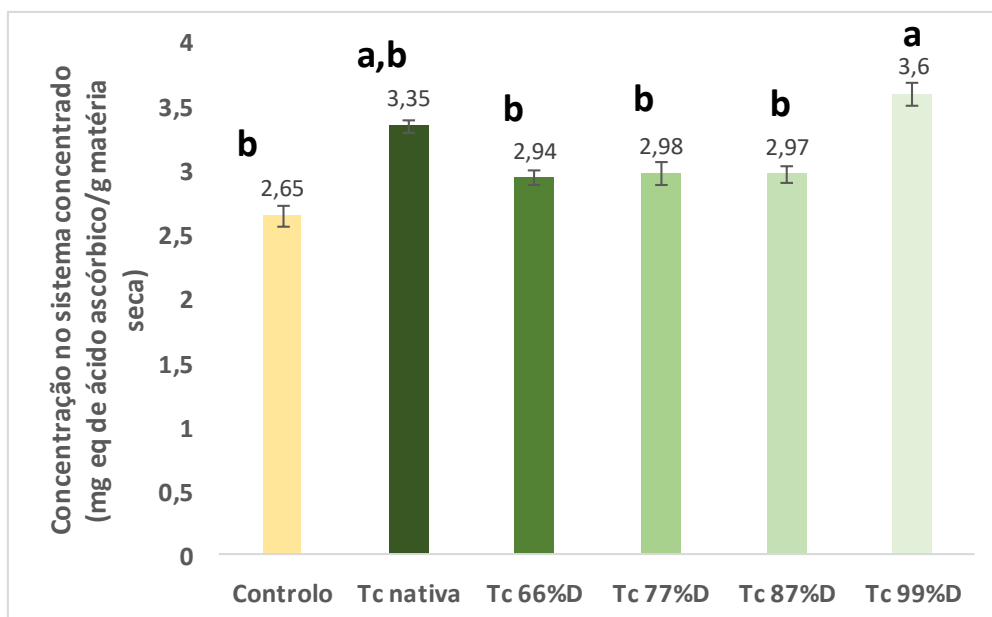


Figura 41 - Resultados obtidos para a massa controlo e massas com incorporação de microalga com diferentes níveis de disrupção, pelo método de DPPH – determinação da atividade antioxidante.

*Letras iguais correspondem a valores não significativamente diferentes entre as massas ($p>0,05$).

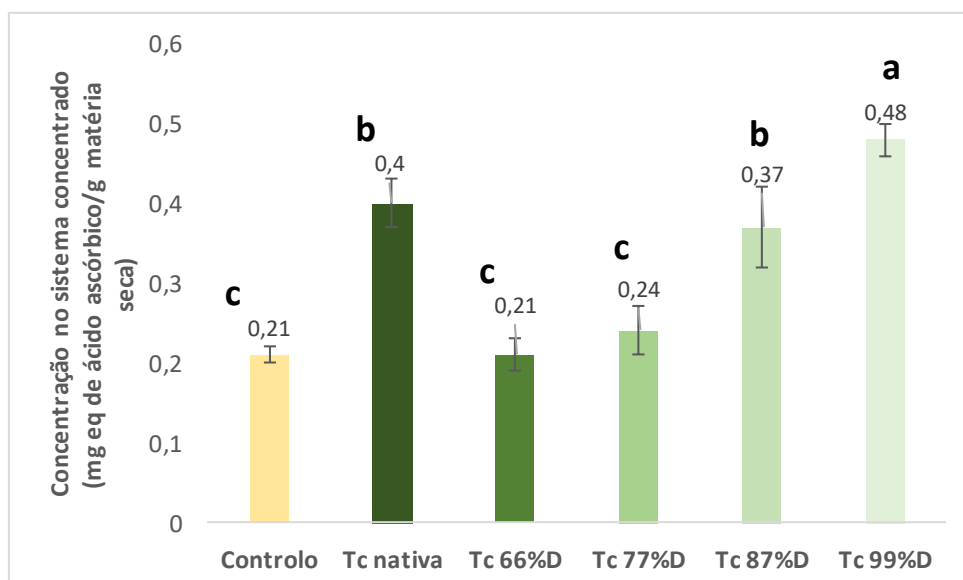


Figura 42 - Resultados obtidos para a massa controlo e massas com incorporação de microalga com diferentes níveis de disrupção, pelo método de FRAP – determinação da atividade antioxidante.

*Letras iguais correspondem a valores não significativamente diferentes entre as massas ($p>0,05$).

Pelo método de F-C obteve-se uma menor concentração de compostos fenólicos totais para a massa controlo (0,11 mg eq de ácido gálico/g de matéria seca) e uma maior concentração destes compostos para a massa com incorporação de microalga com 99% de

disrupção (0,34 mg eq de ácido gálico/g de matéria seca). Através da análise estatística conclui-se que a massa controlo e a massa Tc 99%D são significativamente diferentes ($p < 0,05$) das restantes e entre si. A massa com incorporação de Tc nativa apresenta maior concentração de fenólicos do que as massas com incorporação de Tc 66%D e 77%D, não sendo, no entanto, significativamente diferente da massa Tc 87% D. Através destes resultados é possível concluir que o pré-tratamento da microalga favorece o aumento de compostos fenólicos totais em relação à Tc nativa se promover elevadas percentagens de disrupção celular (99%). Este aumento nos compostos detetados pelo método F -C pode dever-se à maior disponibilidade de compostos bioativos, que se encontram desprotegidos da parede celular e conseguem ser detetados e quantificados. A maior concentração de Tc nativa em relação a Tc 66%D e 77%D pode dever-se à interação da microalga com outros componentes ou à preservação dos compostos fenólicos totais, que ao se encontrarem ainda protegidos pela membrana são menos suscetíveis a quebras de estrutura, tal como demonstrado por (Bonilla-Ahumada, Khandual, and Lugo-Cervantes 2018) que estudaram a concentração de compostos fenólicos totais, ainda microencapsulados, na *Tetraselmis chuii*.

Pelo método DPPH os resultados são obtidos através da concentração de equivalentes de ácido ascórbico por g de matéria seca. Esta forma de apresentar resultados é diretamente proporcional à capacidade antioxidante, logo menores concentrações significam que os extratos possuem menor poder antioxidante. Assim sendo, a massa controlo é a que apresenta menor poder antioxidante (2,65 mg eq de ácido ascórbico/g de matéria seca), sendo significativamente diferente apenas da massa com incorporação de Tc 99% de disrupção ($p < 0,05$). Tal como obtido na quantificação de fenóis totais, a massa com incorporação de Tc com 99% de disrupção é a que apresenta maior concentração de compostos e consequentemente maior atividade antioxidante (3,6 mg eq de ácido ascórbico/g de matéria seca), embora não seja diferente da Tc nativa. Assim é possível concluir que a disrupção não tem impacto na capacidade antioxidante DPPH, podendo ser explicado pela presença de clorofilas, que têm uma enorme capacidade de captar o radical DPPH conferindo consequentemente um elevado poder antioxidante. Estas encontram-se presentes sob forma de clorofila a e b quer em microalgas que tenham ou não sido submetidas a disrupção. A vitamina E, os tocoferóis e tocotrienóis contribuem também para a atividade antioxidante conferida por esta microalga (Batista et al. 2017).

Pelo método FRAP a massa com capacidade antioxidante significativamente superior à Tc nativa é novamente a massa Tc 99%D (0,48 mg eq de ácido ascórbico/g de matéria seca). A análise dos resultados permite estabelecer relação entre os resultados obtidos pelos

métodos F -C e FRAP (embora não exista correlação matemática com significado), observando-se um aumento da concentração de moléculas bioativas com o aumento do grau de ruptura a que a microalga foi submetida ($66\%D = 77\%D < 87\%D < 99\%D$). Assim, pode-se concluir que tal como nos fenólicos, à medida que existe maior disponibilidade de compostos e que se estes se encontram desprotegidos da parede celular, ocorre uma maior deteção e quantificação de compostos bioativos. Esta relação explica o porquê de se combinar o método FRAP com outros, uma vez que este é um método de transferência de eletrões e deteta compostos fenólicos que tenham a capacidade de reduzir Fe^{3+} em Fe^{2+} , no entanto, nem sempre os detetados pelo método dos compostos fenólicos se equiparam aos do método FRAP, devido à dependência do tempo, uma vez que às vezes é necessário mais tempo para quebrar o anel aromático, sendo mais facilmente quantificáveis pelo método de F-C.

Nas Figura 43, Figura 44 e Figura 45 encontram-se representados os resultados para os diferentes pães realizados: controlo e com incorporação de microalga com diferentes níveis de ruptura.

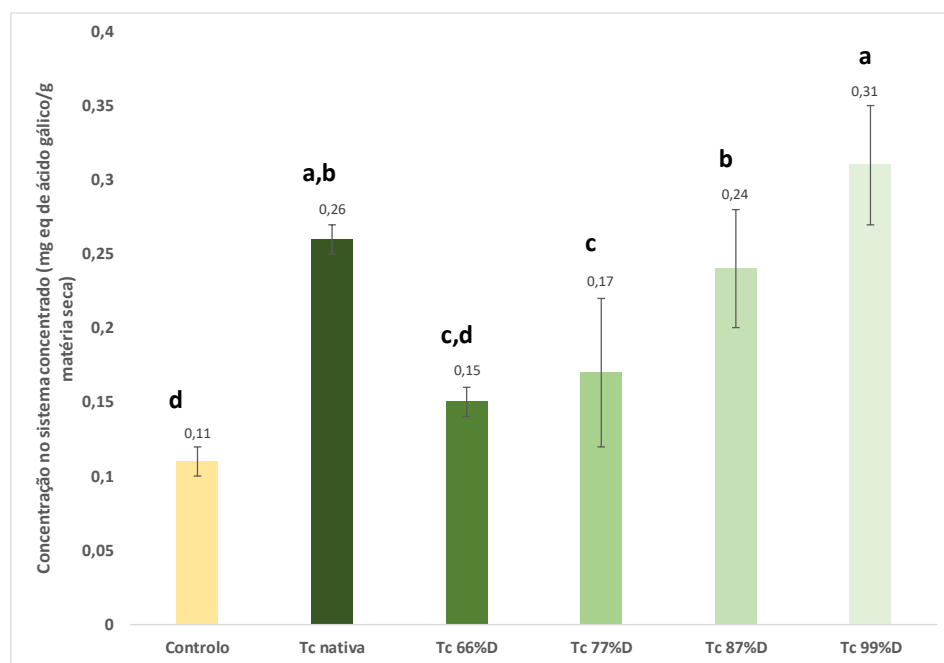


Figura 43 - Resultados obtidos para o pão controlo e pães com incorporação de microalga com diferentes níveis de ruptura, pelo método de F-C – determinação de compostos fenólicos.

*Letras iguais correspondem a valores não significativamente diferentes entre as massas ($p > 0,05$).

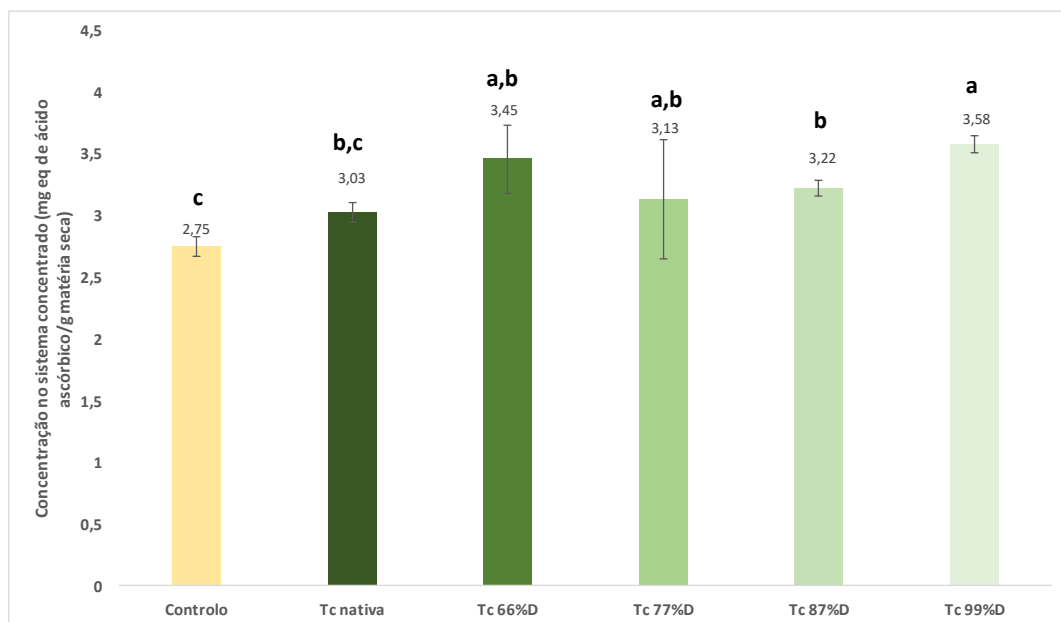


Figura 44 - Resultados obtidos para o pão controlo e pães com incorporação de microalga com diferentes níveis de disrupção, pelo método de DPPH – determinação da atividade antioxidante.

*Letras iguais correspondem a valores não significativamente diferentes entre as massas ($p>0,05$).

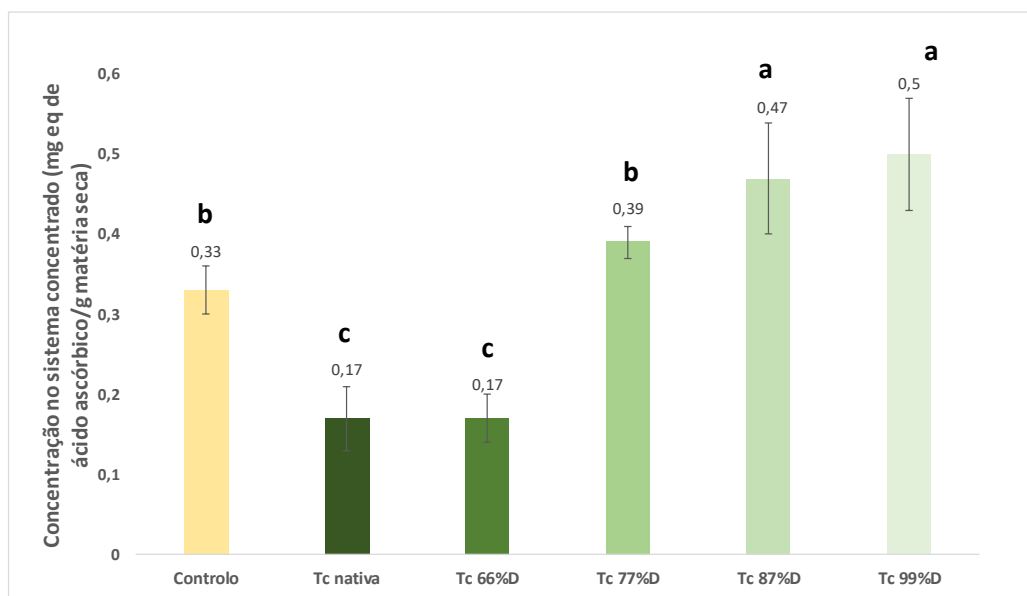


Figura 45 - Resultados obtidos para o pão controlo e pães com incorporação de microalga com diferentes níveis de disrupção, pelo método de FRAP – determinação da atividade antioxidante.

*Letras iguais correspondem a valores não significativamente diferentes entre as massas ($p>0,05$).

Pelo método F-C obteve-se uma menor concentração de compostos fenólicos totais no pão controlo (0,11 mg eq de ácido gálico/g de matéria seca) e uma maior concentração destes compostos no pão com incorporação de microalga com 99% de disrupção (0,31 mg eq de ácido gálico/g de matéria seca). Através da análise estatística é possível concluir que o pão controlo não é significativamente diferente do pão com incorporação de Tc com 66% de

disrupção ($p>0,05$), mas a incorporação de microalga favorece o aumento de compostos fenólicos totais. Relativamente ao pré-tratamento de disrupção, verifica-se que o aumento da percentagem de disrupção conduz ao aumento da concentração de compostos fenólicos, mas não é significativamente superior ($p>0,05$) à do pão com Tc nativa. A elevada concentração destes compostos no pão com microalga sem disrupção, pode dever-se à formação de novos compostos ou à formação de complexos com proteínas do pão e hidratos de carbono que tornam os compostos fenólicos mais difíceis de extrair (Ballester-Sánchez et al. 2019). Quanto maior é a disponibilidade dos compostos de interesse, mais facilmente são detetáveis e quantificáveis, daí percentagens de disrupção maiores corresponderem a valores mais elevados de fenóis

Os resultados obtidos para o pão vão de encontro aos obtidos anteriormente, pelo mesmo método F -C para a massa, havendo uma correlação de resultados com um R^2 de 0,89 (Figura 46)

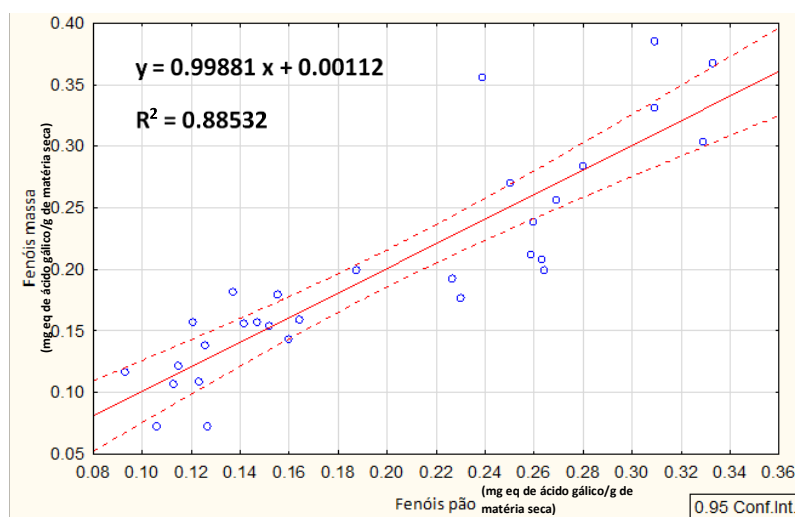


Figura 46 - Correlação entre o método F-C para determinação de compostos fenólicos totais na massa fermentada e no pão com incorporação de microalga.

Usando o método DPPH o pão controlo é o que apresenta menor poder antioxidante (2,75 mg eq de ácido ascórbico/g de matéria seca), sendo significativamente diferente ($p<0,05$) de todos os pães com incorporação de Tc com disrupção celular. O pão com incorporação de Tc com 99% de disrupção não é significativamente diferente dos pães com incorporação de Tc 66%D e 77%D ($p>0,05$), mas apresenta maior capacidade antioxidante do que o pão com Tc nativa.

Nos resultados obtidos através do método FRAP, o pão controlo não é o que apresenta uma menor concentração de compostos que conferem poder antioxidante, mas sim o pão com incorporação de microalga nativa e o pão com incorporação de Tc 66%D (0,17 mg eq de ácido

ascórbico/mg de matéria seca), que apresentam resultados não significativamente diferentes ($p>0,05$). Estes resultados para o pão controlo significam que o pão possui compostos antioxidantes, que são muitas vezes formados durante as reações de Maillard, o que justifica o aumento da bioatividade em relação à massa controlo, apesar do processo de cozedura. Os produtos formados são espécies reativas de oxigénio ou não o são e possuem capacidade de captar radicais e metais, como é o caso do Fe^{2+} , tal como demonstrado nos estudos feitos por (Shen, Chen, and Li 2018) que observaram um aumento da atividade antioxidante pelo método do DPPH e aumento da capacidade de captar o ião Fe^{2+} . Esse aumento está dependente das condições de tempo e temperatura de cozedura e da presença de açúcares, sendo que resultados mais elevados são obtidos com tempos de cozedura mais prolongados (24-40 minutos) a temperaturas moderadas com adição de açúcares. No pão com incorporação de Tc nativa os compostos encapsulados geram uma menor atividade antioxidante, que irá aumentar consoante a disponibilidade de compostos intracelulares libertados durante a disrupção em níveis mais elevados. Em níveis menores, como é o caso de 66% de disrupção os compostos libertados podem sofrer oxidações, apresentando uma menor atividade antioxidante, ou podem não ser detetados por este método. Os pães com incorporação de Tc com maiores graus de disrupção (Tc 87% e 99%D) são os que apresentam maior concentração em compostos com poder antioxidante (cerca de 0,5 mg eq de ácido ascórbico/g de matéria seca), havendo um aumento destes compostos com o aumento da percentagem de disrupção, tal como para os outros dois métodos estudados anteriormente para o pão. (Alashi et al. 2019) demonstraram que um aumento na capacidade de captar os radicais, ou seja, de aumentar o poder antioxidante usando este método, está relacionado com a adição de maior concentração de material de origem vegetal. O mesmo acontece para a capacidade de reduzir o ião Fe^{2+} . Apesar da mesma quantidade de Tc ter sido incorporada nos pães, a disponibilidade varia para cada amostra com diferente percentagem de disrupção.

A relação entre o método F-C e o método FRAP não é tão evidente no pão como foi para a massa. O mesmo é observado por (Ballester-Sánchez et al. 2019) em estudos feitos sobre a adição de farinha de quinoa em pão, concluindo que a cozedura não leva a modificações na capacidade de captar o radical DPPH, enquanto que com o método FRAP foram observados aumentos na capacidade antioxidante. Este aumento é justificado pelas reações de *Maillard*.

4. Conclusões

Com os estudos apresentados na presente dissertação, concluiu-se que a ruptura celular tem impacto nas propriedades funcionais da microalga *Tetraselmis chuii* e nas propriedades tecnológicas dos pães isentos de glúten com incorporação desta microalga, bem como na sua bioatividade.

Nos sistemas diluídos da microalga *Tetraselmis chuii* a 10% (m/v) concluiu-se que, para haver um máximo rendimento de extração de compostos de interesse biológico, é necessária agitação das suspensões durante 5 h. De forma a estudar o impacto da ruptura e também do processamento térmico, foram feitas determinações de compostos de interesse biológico: compostos fenólicos e compostos com capacidade antioxidante, antes e depois do tratamento térmico, para os vários níveis de ruptura celular. Os resultados mostram que o tratamento térmico promove uma diminuição na concentração de compostos fenólicos (Folin-Ciocalteu), contrariamente ao que se verifica para os compostos com capacidade antioxidante através do método DPPH. Para o método FRAP existe uma correlação com R^2 de 0,78 com o método F-C. A ruptura tem impacto na concentração destes compostos, aumentando a bioatividade, e no sistema diluído de microalga nativa (sem ruptura) observou-se menor disponibilidade de compostos, porque se encontram encapsulados no interior das células da microalga.

O comportamento reológico dos sistemas diluídos processados termicamente indica que, com o aumento da percentagem de ruptura, há um aumento do módulo elástico (G'), correspondente a um maior nível de estruturação, com comportamento do tipo gel fraco.

Para os sistemas concentrados, massas e pães, a determinação das propriedades reológicas das massas durante a mistura das farinhas isentas de glúten com incorporação de Tc, recorrendo ao micro-doughLAB, permitiu concluir que a ruptura tem reduzido impacto nos valores da absorção de água e nos parâmetros avaliados neste equipamento.

Com a adição de microalga ocorre aumento da firmeza da massa fermentada, devido ao reforço da estrutura, atribuído ao seu elevado teor em proteína, com diminuição da coesividade. A ruptura não teve impacto nos parâmetros de textura das massas fermentadas e dos pães com incorporação de Tc.

A caracterização das massas fermentadas através da reologia oscilatória permitiu detetar diferenças na estrutura interna das massas. Todas as massas possuem um comportamento predominantemente elástico, e com adição de microalga ocorre um aumento

no nível de estruturação da massa, de acordo com os resultados obtidos para a firmeza. O processo de disrupção não tem impacto na firmeza, coesividade e adesividade das massas, ou o método utilizado para determinação destes parâmetros não é suficientemente sensível para o detetar.

Os pães produzidos com adição de *Tetraselmis chuii* e respetivas massas possuem uma coloração verde, daí o olho humano conseguir detetar diferença de cor entre os pães e massas com diferentes níveis de disrupção.

De forma a comparar os resultados obtidos para os sistemas diluídos de microalga e determinar os níveis elevados de compostos bioativos nas massas e pães, foram utilizadas as mesmas metodologias para determinação dos compostos fenólicos e compostos com capacidade antioxidante.

A incorporação de microalga favorece o aumento dos compostos fenólicos totais na massa e no pão e com o aumento da percentagem de disrupção ocorre o aumento da concentração destes compostos. Isto ocorre porque existe uma maior disponibilidade de compostos que estão desprotegidos da parede celular e conseguem assim ser detetados por este método.

O poder antioxidante DPPH é menor para a massa controlo e maior para a massa com maior grau de disrupção (99%). As microalgas são uma grande fonte de compostos com capacidade antioxidante uma vez que têm na sua constituição compostos com grande capacidade de captação de radicais como a clorofila, vitamina E e tocoferóis. Assim sendo, a incorporação de microalga favorece o aumento da atividade antioxidante, sendo que a disrupção também tem impacto na mesma, tanto para as massas fermentadas como para os pães.

Existe correlação entre o método de F-C e FRAP, que determina a concentração de compostos com capacidade antioxidante, uma vez que para a metodologia FRAP ocorre aumento de concentração de componentes de interesse com o aumento da disrupção a que a microalga foi submetida, tanto para massas fermentadas como para os pães.

O tratamento térmico a que os dois sistemas foram sujeitos mostram que os sistemas concentrados, tanto massa fermentada, como pão, foram submetidos a condições mais extremas e adversas, comparado com o tratamento térmico a que os sistemas diluídos foram submetidas. As condições extremas e adversas podem levar à degradação ou formação de complexos que confirmam maior atividade antioxidante ao pão, como por exemplo, reações de Maillard, responsáveis pelo aumento na capacidade antioxidante.

5. Bibliografia

- Ahmad, Shabir, Manzoor Ahmad, Haroon Rashid, and Imtiyaz Ahmad. 2016. "Trends in Food Science & Technology In Influence of Hydrocolloids on Dough Handling and Technological Properties of Gluten-Free Breads." *Trends in Food Science & Technology* 51: 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.03.005>.
- Alashi, Adeola M, Kehinde A Taiwo, Durodoluwa J Oyedele, Odunayo C Adebooye, and Rotimi E Aluko. 2019. "Polyphenol Composition and Antioxidant Properties of Vegetable Leaf- Fortified Bread." *Food Biochemistry*, 1–9. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12625>.
- Alvarez-Jubete, L., E. Arendt, and E. Gallagher. 2009. "Nutritive Value and Chemical Composition of Pseudocereals as Gluten-Free Ingredients." *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 60 (sup4): 240–57.
- Alves, C.Q., J.M. David, J.P. David, M.V. Bahia, and R.M. Aguiar. 2010. "Métodos Para Determinação de Actividade Antioxidante In Vitro Em Substratos Orgânicos." In *Química Nova*, 2202–10.
- André, C, I Castanheira, J M Cruz, P Paseiro, and A Sanches-silva. 2010. "Analytical Strategies to Evaluate Antioxidants in Food : A Review." *Trends in Food Science & Technology* 21 (5): 229–46. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.12.003>.
- APC. 2019. "Associação Portuguesa de Celiacos." 2019. <https://www.celiacos.org.pt/>.
- Awuah, G B, H S Ramaswamy, and A Economides. 2007. "Thermal Processing and Quality : Principles and Overview." *Chemical Engineering and Processing* 46: 584–602. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2006.08.004>.
- Ballester-Sánchez, Jaime, Jose Vicente Gil, Claudia Monika Haros, and María Teresa Fernández-Espinar. 2019. "Effect of Incorporating White , Red or Black Quinoa Flours on Free and Bound Polyphenol Content , Antioxidant Activity and Colour of Bread," 185–91.
- Barba, Francisco J, Lilian R B Mariutti, Neura Bragagnolo, Adriana Z Mercadante, Gustavo V Barbosa-Cánovas, and Vibeke Orlien. 2017. "Bioaccessibility of Bioactive Compounds from Fruits and Vegetables after Thermal and Nonthermal Processing." *Trends in Food Science & Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.07.006>.

- Batista, Ana Paula. 2013. "Natural Pigments and Microalgal Biomass in Colloidal Food Systems : Rheological Characterization." Universidad de Huelva.
- Batista, Ana Paula, Luísa Gouveia, Narcisa M Bandarra, José M Franco, and Anabela Raymundo. 2013. "Comparison of Microalgal Biomass pro Fi Les as Novel Functional Ingredient for Food Products." *ALGAL* 2 (2): 164–73.
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.01.004>.
- Batista, Ana Paula, Alberto Niccolai, Patrícia Fradinho, Solange Fragoso, Ivana Bursic, Liliana Rodol, Natascia Biondi, Mario R Tredici, Isabel Sousa, and Anabela Raymundo. 2017. "Microalgae Biomass as an Alternative Ingredient in Cookies : Sensory , Physical and Chemical Properties , Antioxidant Activity and in Vitro Digestibility." *Algal Research* 26: 161–71. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.07.017>.
- Becker, Doreen. 2016. "Color Trends and Selection for Product Design." In *Plastics Design Library*, 284. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/C2014-0-04227-X>.
- Bernaerts, Tom M M, Agnese Panozzo, Veerle Doumen, Imogen Foubert, Lore Gheysen, Koen Goiris, Paula Moldenaers, Marc E Hendrickx, and Ann M Van Loey. 2017. "Microalgal Biomass as a (Multi) Functional Ingredient in Food Products : Rheological Properties of Microalgal Suspensions as a Ff Ected by Mechanical and Thermal Processing" 25 (May): 452–63.
- Bonilla-Ahumada, Felipe De Jesús, Sanghamitra Khandual, and Eugenia Carmen Lugo-Cervantes. 2018. "Microencapsulation of Algal Biomass (Tetraselmis Chuii) by Spray-Drying Using Di Ff Erent Encapsulation Materials for Better Preservation of Beta-Carotene and Antioxidant Compounds." *Algal Research* 36 (April): 229–38.
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.10.006>.
- Butcher, E.W. 1959. *Microalgae for Human and Animal Consumption. Microalgal Technology*. Edited by M.A. Borowitzka and L.J. Borowitzka. Cambridge: Cambridge University Press.
- Capriles, Vanessa D., and José Alfredo G. Arêas. 2014. "Novel Approaches in Gluten-Free Breadmaking: Interface between Food Science, Nutrition, and Health." *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 13 (5).
- Capriles, Vanessa D., Fernanda G. dos Santos, and José Alfredo G. Arêas. 2016. "Gluten-Free Breadmaking : Improving Nutritional and Bioactive Compounds." *Journal of Cereal Science* 67. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2015.08.005>.

- Castro, A. 2003. *A Química e a Reologia No Processamento de Alimentos (Ciência e Técnica)*. Edited by Piaget. Lisboa.
- Choi, Y, S M Lee, J Chun, H B Lee, and J Lee. 2006. "Food Chemistry Influence of Heat Treatment on the Antioxidant Activities and Polyphenolic Compounds of Shiitake (*Lentinus Edodes*) Mushroom." *Food Chemistry* 99: 381–87.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.08.004>.
- Cornel, H.J., and A.W. Hoveling. 1998. *Wheat Chemistry and Utilization*. 1st ed. Suíça: Technomic Publishing Company Inc.
- Dai, Jin, and Russell J Mumper. 2010. "Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties," 7313–52.
<https://doi.org/10.3390/molecules15107313>.
- Delleau, S., M. Baradat, F. Guéraud, and L. Huc. 2013. "Cell Death and Diseases Related to Oxidative Stress:4-Hydroxynonenal (HNE)." In *The Balance. Cell Death & Differentiation*, 1615–30.
- Demirkesen, Ilkem, Behic Mert, Gulum Sumnu, and Serpil Sahin. 2010. "Rheological Properties of Gluten-Free Bread Formulations." *Journal of Food Engineering* 96 (2): 295–303. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.08.004>.
- Dias, H.P., D.S. Paiva, W. Romão, and D.C. Endringer. 2014. "Identificação de Polifenóis : Sequência Pedagógica Para o Ensino Médio." *Revista Virtual Química*, 2014.
<https://doi.org/10.5935/1984-6835.20140032>.
- EFSA, European Food Safety Authority. 2015. "Safety of a Change in Specifications for the Food Additive Hydroxypropyl Methyl Cellulose (E 464)." *EFSA Journal*.
- FAO. 2008. "Codex Alimentarius. Standard for Foods for Special Dietary Use for Persons Intolerant to Gluten. CODEX STAN 118-1979." 2008. <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/en/>.
- FAO, Food and Agriculture Organization. 2011. "Hydroxypropylmethyl Cellulose." 2011.
http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/jecfa_additives/docs/monograph11/additive-233-m11.pdf.
- Fernandes, Isabel. 2019. "Desenvolvimento de Pão Sem Glúten Enriquecido Com Tetraselmis Chuii." Universidade de Lisboa. - Instituto Superior de Agronomia. Tese de Mestrado em Engenharia Alimentar.

- Ferruzzi, Mario G, and Joshua Blakeslee. 2007. "Digestion , Absorption , and Cancer Preventative Activity of Dietary Chlorophyll Derivatives" 27: 1–12.
<https://doi.org/10.1016/j.nutres.2006.12.003>.
- Figueira, Silva, Tainara de Moraes Crizel, Camila Rubira Silva, and Myriam de las Mercedes Salas-Mellado. 2011. "Pão Sem Glúten Enriquecido Com a Microalga Spirulina Platensis Elaboration of Gluten-Free Bread Enriched with the Microalgae Spirulina Platensis." *Brazilian Journal of Food Technology* 14 (4): 308–16.
<https://doi.org/10.4260/BJFT2011140400037>.
- Friedman, H, James E Whitney, and Alina Surmacka Szczesniak. 1963. "The Texturometer- A New Instrument Objective Texture Measurement." *Food Science* 28: 390–96.
- García-Segovia, Purificación, María J Pagán-Moreno, Irene F Lara, and Javier Martínez-Monzó. 2017. "Effect of Microalgae Incorporation on Physicochemical and Textural Properties in Wheat Bread Formulation." *Food Science and Technology International*, 1–11. <https://doi.org/10.1177/1082013217700259>.
- Gouveia, L, A P Batista, I Sousa, and A Raymundo. 2008. *Microalgae in Novel Food Products*. Edited by pp. Konstantinos N. Papadopoulos. *Food Chemistry*. © 2008 Nova Science Publishers, Inc.
- Gouveia, Luísa, Ana Paula Batista, Ana Miranda, José Empis, and Anabela Raymundo. 2007. "Chlorella Vulgaris Biomass Used as Colouring Source in Traditional Butter Cookies." *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 8: 433–36.
<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.03.026>.
- Graça, C, P Fradinho, I Sousa, and A Raymundo. 2018. "LWT - Food Science and Technology Impact of Chlorella Vulgaris on the Rheology of Wheat Fl Our Dough and Bread Texture." *LWT - Food Science and Technology* 89: 466–74.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.11.024>.
- Grossmann, Lutz, Jörg Hinrichs, H Douglas Goff, and Jochen Weiss. 2019. "Heat-Induced Gel Formation of a Protein-Rich Extract from the Microalga Chlorella Sorokiniana." *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 56: 9.
<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.06.001>.
- Guedes, A Catarina, Helena M Amaro, Maria S Gião, and F Xavier Malcata. 2013. "Optimization of ABTS Radical Cation Assay Specifically for Determination of Antioxidant Capacity of Intracellular Extracts of Microalgae and Cyanobacteria." *Food*

- Chemistry* 138 (1): 638–43. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.106>.
- Guimarães, Wesson, Maria Isabel Ribeiro Alves, and Nelson Roberto Antoniosi Filho. 2012. “ANTOCIANINAS EM EXTRATOS VEGETAIS: APLICAÇÃO EM TITULAÇÃO ÁCIDO-BASE E IDENTIFICAÇÃO VIA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA/ESPECTROMETRIA DE MASSAS.” *Quimica Nova* 35 (8): 1673–79.
- Gulçin, İlhami. 2012. “Antioxidant Activity of Food Constituents : An Overview,” 345–91. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0774-2>.
- Hager, Anna-sophie, and Elke K Arendt. 2013. “Food Hydrocolloids In Influence of Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC), Xanthan Gum and Their Combination on Loaf Specific Volume , Crumb Hardness and Crumb Grain Characteristics of Gluten-Free Breads Based on Rice , Maize , Teff and Buckwheat.” *Food Hydrocolloids* 32 (1): 195–203. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.12.021>.
- Horstmann, Stefan W, Kieran M Lynch, and Elke K Arendt. 2017. “Starch Characteristics Linked to Gluten-Free Products.” <https://doi.org/10.3390/foods6040029>.
- Ishii, Toshihiro. 2018. “Application 59 - Development of New Materials by the Mild Dispersion of Nanoparticles in Slurries by Bead Milling.” In *Nanoparticle Technology*, edited by Makio Naito, Toyokazu Yokoyama, Kouhei Hosokawa, and Nogi. Kiyoshi, 3rd ed., 715/719. Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/C2017-0-01011-X>.
- Klimczak, Inga, Maria Malecka, Mirosława Szlachta, and Anna Gliszczyńska-Swigło. 2007. “Effect of Storage on the Content of Polyphenols , Vitamin C and the Antioxidant Activity of Orange Juices” 20: 313–22. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.02.012>.
- Korus, Jarosław, Lesław Juszczak, Rafał Ziobro, Mariusz Witczak, Katarzyna Grzelak, and Michał Sójka. 2011. “DEFATTED STRAWBERRY AND BLACKCURRANT SEEDS AS FUNCTIONAL INGREDIENTS OF GLUTEN-FREE BREAD.” *Journal of Texture Studies* 43 (1).
- Kusznierewicz, Barbara, Anna Smiechowska, Agnieszka Bartoszek, and Jacek Namiesnik. 2008. “Food Chemistry The Effect of Heating and Fermenting on Antioxidant Properties of White Cabbage.” *Food Chemistry* 108: 853–61. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.049>.
- Lee, Andrew K, David M Lewis, and Peter J Ashman. 2012. “Disruption of Microalgal Cells for the Extraction of Lipids for Biofuels : Processes and Specific Energy Requirements.”

- Biomass and Bioenergy* 46: 89–101. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.06.034>.
- Lee, Soo Youn, Jun Muk Cho, Yong Keun Chang, and You-Kwan Oh. 2017. "Bioresource Technology Cell Disruption and Lipid Extraction for Microalgal Biorefineries : A Review." *Bioresource Technology* 244: 1317–28. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.038>.
- Li, Hua-Bin, Ka-Wing Cheng, Chi-Chun Wong, King-Wai Fan, Feng Chen, and Yue Jiang. 2007. "Food Chemistry Evaluation of Antioxidant Capacity and Total Phenolic Content of Different Fractions of Selected Microalgae" 102: 771–76. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.06.022>.
- Liaotrakoon, Wijitra, Nathalie de Clercq, Vera Van Hoed, Davy Van de Walle, Benny Lewille, and Koen Dewettinck. 2013. "Impact of Thermal Treatment on Physicochemical , Antioxidative and Rheological Properties of White-Flesh and Red-Flesh Dragon Fruit (*Hylocereus* Spp .) Purees." *Food and Bioprocess Technology* 6: 416–30. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0722-4>.
- Lobo, V., A. Patil, A. Phatak, and N. Chandra. 2010. "Free Radicals, Antioxidants and Functional Foods: Impact on Human Health." *Pharmacognosy Review*, 4: 118–26.
- Machu, Ludmila, Ladislava Misurcova, Jarmila Vavra Ambrozova, Jana Orsavova, Jiri Mlcek, Jiri Sochor, and Tunde Jurikova. 2015. "Phenolic Content and Antioxidant Capacity in Algal Food Products," 1118–33. <https://doi.org/10.3390/molecules20011118>.
- Mancebo, C.M., M.A.S. Miguel, M.M. Martinez, and M. Gomez. 2015. "Optimisation of Rheological Properties of Gluten-Free Doughs with HPMC, Psyllium and Different Levels of Water." *Journal of Cereal Science* 61: 8 e 15.
- Minarro, B., E. Albanell, N. Aguilar, B. Guamis, and M. Capellas. 2012. "Effect of Legume Flours on Baking Characteristics of Gluten-Free Bread." *Journal of Cereal Science* 56 (2): 476–81.
- Mohammadi, Mehdi, Najmeh Kazeroni, and Mehran Javaheri Baboli. 2015. "Fatty Acid Composition of the Marine Micro Alga *Tetraselmis Chuii* Butcher in Response to Culture Conditions" 6 (2): 49–55.
- Mokrzycki, Wojciech, and Maciej Tatol. 2011. "Color Difference Delta E - A Survey." *Machine Graphics and Vision* 20 (4): 383–411.
- Murthy, K N Chidambara, A Vanitha, J Rajesha, M Mahadeva Swamy, P R Sowmya, and Gokare A Ravishankar. 2005. "In Vivo Antioxidant Activity of Carotenoids from

- Dunaliella Salina — a Green Microalga” 76: 1381–90.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.10.015>.
- Naqash, Farah, Asir Gani, Adil Gani, and F A Masoodi. 2017. “Trends in Food Science & Technology Gluten-Free Baking : Combating the Challenges - A Review.” *Trends in Food Science & Technology* 66: 98–107. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.06.004>.
- Nascimento, K., M. Barbosa, and C. Takeiti. 2012. “Doença Celíaca: Sintomas, Diagnóstico e Tratamento Nutricional.” *Saúde Em Revista*, 2012.
- Nobre, S.R., T. Silva, and J.E.P. Cabral. 2007. “Doença Celíaca Revisitada.” *Jornal Português de Gastreenterologia* 14 (1): 184–93.
- O’Shea, Norah, Linda Doran, Mark Auty, Elke Arendt, and Eimear Gallagher. 2013. “The Rheology, Microstructure and Sensory Characteristics of a Gluten-Free Bread Formulation Enhanced with Orange Pomace.” *Food and Function* 4 (12): 1856–63.
- Oktaya, Munir, İlhami Gulcin, and O. İrfan Kufrevioğlu. 2003. “Determination of in Vitro Antioxidant Activity of Fennel (*Foeniculum Vulgare*) Seed Extracts” 36: 263–71.
[https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(02\)00226-8](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(02)00226-8).
- Perten Instruments. 2017. “Micro-DoughLAB 2800 Installation and Operation Manual.” In , 103.
- Pulz, Otto, and Wolfgang Gross. 2004. “Valuable Products from Biotechnology of Microalgae,” 635–48. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1647-x>.
- Rakic, Sveto, Silvana Petrovic, Jelena Kukic, Milka Jadranin, Vele Tesevic, Dragan Povrenovic, and Slavica Siler-Marinkovic. 2007. “Influence of Thermal Treatment on Phenolic Compounds and Antioxidant Properties of Oak Acorns from Serbia.” *Food Chemistry* 104: 830–34. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.025>.
- Ratti, Cristina. 2012. “Freeze - Drying Process Design.” In *Handbook of Food Process Design*, edited by Jasim Ahmed and Mohammed Shaflur Rahman, First Edit, 621–47. Blackwell Publishing Ltd.
- Rawson, A, A Patras, B K Tiwari, F Noci, T Koutchma, and N Brunton. 2011. “Effect of Thermal and Non Thermal Processing Technologies on the Bioactive Content of Exotic Fruits and Their Products : Review of Recent Advances.” *Food Research International* 44 (7): 1875–87. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.02.053>.
- Raymundo, Anabela, Maria Cristiana Nunes, and Isabel Sousa. 2019. “Microalgae Biomass

as a Food -Ingredient to Design Added Value Products.” In *Valorising Seaweed By-Products*, edited by María Dolores Torres Pérez and Herminia Domínguez González, 1st ed., 145–95. Nova Science Publishers, Inc.

Regulamento de Execução (UE) 2017/2470. 2017.

Rufino, Maria do Socorro Moura, Ricardo Elesbão Alves, Edy Sousa de Brito, Selene Maia de Moraes, Caroline de Goes Sampaio, Jara Pérez-Jiménez, and Fulgencio Diego Saura-Calixto. 2006. “Metodologia Científica: Determinação Da Atividade Antioxidante Total Em Frutas Pelo Método de Redução Do Ferro (FRAP).”

Sabanis, Dimitrios, Constantina Tzia, and Spyridon Papadakis. 2008. “Effect of Different Raisin Juice Preparations on Selected Properties of Gluten-Free Bread.” *Food and Bioprocess Technology* 1 (4): 374–83.

Safi, Carl, Christine Frances, Alina Violeta Ursu, Céline Laroche, Carlos Vaca-garcia, Pierre-yves Pontalier, Carl Safi, et al. 2015. “Understanding the Effect of Cell Disruption Methods on the Diffusion of *Chlorella Vulgaris* Proteins and Pigments in the Aqueous Phase To Cite This Version : HAL Id : Hal-01658654.” In *Algal Research - Biomass, Biofuels and Bioproducts*, 61–68. Elsevier.

Sánchez-Moreno, Concepción, José A. Larrauri, and Fulgencio Saura-Calixto. 1999. “Free Radical Scavenging Capacity and Inhibition of Lipid Oxidation of Wines, Grape Juices and Related Polyphenolic Constituents.” *Food Research International* 32 (6): 407–12. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(99\)00097-6](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(99)00097-6).

Schofield, J. 1996. *Wheat Structure: Biochemistry and Functionality*. 1st ed. Reino Unido: Royal Society of Chemistry.

Schwenzfeier, Anja, Peter Alexander Wierenga, and Harry Gruppen. 2011. “Bioresource Technology Isolation and Characterization of Soluble Protein from the Green Microalgae.” *Bioresource Technology* 102 (19): 9121–27. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.07.046>.

Shen, Yanting, Gengjun Chen, and Yonghui Li. 2018. “Bread Characteristics and Antioxidant Activities of Maillard Reaction Products of White Pan Bread Containing Various Sugars.” *Food Science and Technology* 95: 308–15.

Son, Young Ae, Jee Ae Shim, Soyoung Hong, and Mi Kyung Kim. 2009. “Intake of *Chlorella Vulgaris* Improves Antioxidative Capacity in Rats Oxidatively Stressed with Dietary

- Cadmium” 750: 7–14. <https://doi.org/10.1159/000199453>.
- Sousa, I. 2001. “A Reologia Dos Produtos Alimentares.” In *Reologia e as Suas Aplicações Industriais*, edited by A Gomes de Castro, J.A. Covas, and A.C. Diogo, Instituto, 131–57. Lisboa.
- Steffolani, Eugenia, Esther de la Hera, Gabriela Pérez, and Manuel Gómez. 2014. “Effect of Chia (*Salvia Hispanica* L) Addition on the Quality of Gluten-Free Bread.” *Journal of Food Quality* 37 (5).
- Sun-Waterhouse, Dongxiao, Juan Chen, Cheryll Chuah, Reginald Wibisono, Laurence D. Melton, William Laing, Lynette R. Ferguson, and Margot A. Skinner. 2009. “Kiwifruit-Based Polyphenols and Related Antioxidants for Functional Foods: Kiwifruit Extract-Enhanced Gluten-Free Bread.” *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 60 (sup7): 251–64.
- Traber, Maret G, and Jeffrey Atkinson. 2007. “Vitamin E , Antioxidant and Nothing More” 43: 4–15. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.03.024>.
- Velioglu, Y S, G Mazza, L Gao, and B D Oomah. 1998. “Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits , Vegetables , and Grain Products,” 4113–17.
- Wang, Kun, Fei Lu, Zhe Li, Lichun Zhao, and Chunyang Han. 2017. “Recent Developments in Gluten-Free Bread Baking Approaches : A Review” 37: 1–9.
- Wang, Lin, Bishu Pan, Jianchun Sheng, Juan Xu, and Qiuhui Hu. 2007. “Food Chemistry Antioxidant Activity of *Spirulina Platensis* Extracts by Supercritical Carbon Dioxide Extraction” 105: 36–41. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.03.054>.
- Xu, Xiaojuan, Zhigang Luo, Qingyu Yang, Zhigang Xiao, and Xuanxuan Lu. 2019. “Effect of Quinoa Fl Our on Baking Performance , Antioxidant Properties and Digestibility of Wheat Bread.” *Food Chemistry* 294: 87–95. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.037>.
- Zhang, Donglin, and Yasunori Hamauzu. 2004. “Food Chemistry Phenolics , Ascorbic Acid , Carotenoids and Antioxidant Activity of Broccoli and Their Changes during Conventional and Microwave Cooking.” *Food Ch* 88: 503–9. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.01.065>.

Impact of cell disruption and thermal processing on rheological properties and antioxidant activity of microalgal suspensions

M.C. Nunes¹, I. Vasco¹, M. Kokkali², K. Kousoulaki², I. Sousa¹, A. Raymundo¹

¹LEAF – Linking Landscape, Environment, Agriculture and Food, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa (Portugal)

²NOFIMA, Nutrition and Feed Technology Department, Bergen (Norway)

e-mail of the presenter: cmunes@gmail.com

The bioactivity of microalgal biomass added to food systems is conditioned by the thermal and mechanical processing intensity. Microalgae are known to contain a significant amount of health nutrients [1] naturally encapsulated within cells, being able to resist harsh technological conditions during food processing. However, microalgal cell wall disruption may significantly increase nutrient availability and could be required as a pretreatment [2] to enhance functionality.

Biomass cell wall disruption was applied to promote a controlled release of the active biocompounds. *Tetraselmis chuii* (Tc) fresh biomass was pre-processed by bead milling mechanical treatment in the pilot unit of NOFIMA and freeze-dried. Tc dried biomass with different degree of cell disruption (61%, 77%, 87% and 99%) and integrate Tc without disruption were compared by rheology characterization of aqueous suspensions (10% w/v), before and after thermal treatment. Steady-state flow behaviour at 20°C and after heating to 90°C and subsequent cooling to 20°C was studied, with all the microalgae suspensions exhibiting a shear-thinning behaviour. Temperature, time and frequency sweeps after cooling also evidenced the impact of mechanical and thermal treatment on the rheological properties.

The antioxidant activity of Tc suspensions was also determined by DPPH and FRAP methodologies, demonstrating the impact of different degree of cell disruption and thermal processing.

This work demonstrates the effect of thermal processing on the rheological properties of microalgae suspensions, as affected by the previous cell wall disruption through mechanical pretreatment. The thermal processing showed to enhance interactions between the released cell material after cell wall disruption. In conclusion, *Tetraselmis chuii* biomass could find applications as a promising multifunctional ingredient in food products which are thermally processed.

Keywords: *Tetraselmis chuii*, cell disruption, rheology, bioactivity.

Acknowledgements: Portuguese Foundation for Science and Technology (FCT), UID/AGR/04129/2013 – LEAF; Research Council of Norway, Algae to Future (A2F) Project n.º 267872/E50.

References

[1] Batista, A.P., Gouveia, L., Bandarra, N.M., Franco, J.M., Raymundo, A. (2013). Comparison of microalgal biomass profiles as novel functional ingredient for food products. *Algal Research*, 2:164-173.

[2] Raymundo, A., Nunes, M.C., Sousa, I. Microalgae biomass as a food ingredient to design added value products. In Valorising seaweed by-products. Ed. Herminia Dominguez & M.D. Torres. Nova Science Publishers. (In Press).

IMPROVING GLUTEN FREE BREAD BIOACTIVITY WITH TETRASELMIS CHUII DISRUPTED BIOMASS (Oral Presentation)

M. Cristiana Nunes^{1*}, Inês Vasco¹, Marilena Kokkali², Katerina Kousoulaki², Isabel Sousa¹, Anabela Raymundo¹

¹ Universidade de Lisboa / Instituto Superior de Agronomia, LEAF-Linking Landscape, Environment, Agriculture and Food / Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisboa, Portugal.

² NOFIMA AS, Nutrition and Feed Technology Department, Postboks 5844 Oasen, 5828 Bergen, Norway.

**Maria Cristiana Nunes
Researcher**

Universidade de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia
Portugal

* crnunes@gmail.com

About the author:

Maria Cristiana Nunes holds a 5 year graduation and a PhD in Food Engineering by Instituto Superior de Agronomia (ISA) from Universidade de Lisboa. She is currently Assistant Professor at the Universidade Lusófona, responsible for curricular units of Food Technology and Food Safety and a member of LEAF Research Center of ISA (UI/AGR/04129). Has a Post-doc research position in the Project A2F – Algae to Future supported by the Research Council of Norway's BIONÆR and collaborates in other on going LEAF's projects.

Main research areas of interest: Main work focused on the use of poorly exploited food sources (e.g. microalgae biomass and food industry by-products) for the development of high added value products; functional properties of macromolecules - proteins and polysaccharides; development of new food products; evaluation of the rheological behavior of different food matrices.

Company info:

Web site: <https://www.isa.ulisboa.pt/en/leaf/presentation>

Telephone: +351 21 365 3100

E-Mail: cqisa@isa.ulisboa.pt

Abstract:

This work is part of the Algae2Future project that intends to explore the microalgae potential to be a low-carbon-footprint healthy food and feed ingredient. One of the objectives is to increase nutritional quality of bread by addition of microalgae, which is particularly important in gluten-free bread, since celiac patient's have nutritional deficiencies due to their absorption limitations. A formulation based on buckwheat, rice flours and potato starch was enriched with *Tetraselmis chuii* (Tc) biomass.

The bioactivity of the microalgae added to food systems is conditioned by the processing operations, mainly thermal conditions (time and temperature), i.e. – baking. However, microalgae cell wall disruption may be necessary as a step of the downstream process to improve nutrient availability and functionality, since biomolecules are naturally encapsulated within the cells [1].

In this study, biomass cell disruption was applied to promote a controlled release of the bioactive compounds. Tc fresh biomass was pre-processed by bead milling mechanical treatment in the pilot unit of NOFIMA and freeze-dried, producing dried biomass with different degree of cell disruption.

Aqueous suspensions of Tc dried biomass (non-disrupted, 66%, 77% and 99% cell disruption) were compared using antioxidant capacity (DPPH and FRAP) and total phenolic (*Folin–Ciocalteu*) assays, before and after thermal treatment. Microalgal samples were also used to make gluten-free doughs and breads and study the impact of cell disruption and baking (thermal processing) on dough rheology, bread quality and bioactivity, demonstrating that *Tetraselmis chuii* could find applications as a promising functional ingredient in food products which are thermally processed.

Acknowledgments: Portuguese Foundation for Science and Technology (FCT) - UID/AGR/04129/2013 – LEAF; Research Council of Norway, Algae to Future (A2F) Project.

Keywords: *Tetraselmis chuii*, cell disruption, gluten-free bread, bioactivity, rheology.

References:

[1] Raymundo, A., Nunes, M.C., Sousa, I. (2019). Microalgae biomass as a food ingredient to design added value products. In Valorising seaweed by-products. Ed. Herminia Domínguez & María D. Torres. Nova Science Publishers. ISBN: 978-1-53615-398-9.